DIE INITIATORWIRKUNG O,S-SUBSTITUIERTER L-CYSTEIN-DERIVATE BEI DEM AUFBAU VON POLYMEREN AUS AMINOSAEURE-N-CARBONSAEURE-ANHYDRIDEN IN DIOXAN ; UND DIE BEDEUTUNG DES SCHWEFELS FUER POLARISATIONEN DER PEPTIDKETTE.

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch - Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Freien Universität Berlin 1961

vorgelegt von

Dieter Vollmann

aus Altenburg

DIE INITIATORWIRKUNG O,S-SUBSTITUIERTER L-CYSTEIN-DERIVATE BEI DEM AUFBAU VON POLYMEREN AUS AMINOSAEURE-N-CARBONSAEURE-ANHYDRIDEN IN DIOXAN ; UND DIE BEDEUTUNG DES SCHWEFELS FUER POLARISATIONEN DER PEPTIDKETTE.

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch - Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Dieter Vollmann

aus Altenburg

1. Berichterstatter:

Herr Professor Dr. W. Lautsch

2. Berichterstatter:

Herr Professor Dr. R. Riemschneider

Tag der mündlichen Prüfung: 26. November 1960

Tag der Promotion: 27. Feb. 1961

Inhaltsverzeichnis.

A. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG - 3 -

B. AUSFUEHRUNG

1. Darstellung O,S-substituierter L-Cystein-Initiatoren und der AS-N-Carbonsäureanhydride - 5 -

2. Manometrische Messung der Polykondensationen in der Warburg-Apparatur - 9 -

3. Nachweis katalytischer Sauerstoffübertragung auf Dioxan - 13 -

4. Deutung der unterschiedlichen Wirkungsweise O,S-substituierter L-Cystein-Initiatoren - 23 -

5. Das chemische Verhalten von S-Alkyl- und S-Acyl-Endgruppen an L-Cystein substituierten Polypeptiden auf L-Glutaminsäure- und L-Lysin-Basis - 29 -

6. Spektroskopische Eigenschaften von Polypeptiden des L-Lysin-Typus mit und ohne L-Cystin-Wirkungsgruppe - 34 -

7. Der Einfluß von wasserfreier Dichloressigsäure auf Poly-L-Lysin-HBr mit und ohne L-Cystin-Wirkungsgruppe - 41 -

C. ZUSAMMENFASSUNG - 44 -

D. EXPERIMENTELLER TEIL - 45 -

E. LITERATURVERZEICHNIS - 61 -

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546826_0048

A. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Seit der Auffindung der ersten Enzyme und dem Nachweis ihrer Zusammensetzung aus Co- und Apoferment fanden hauptsächlich Untersuchungen über die chemische Konstitution der prosthetischen Gruppen und die Aufklärung der von ihnen katalysierten Teilreaktionen bevorzugtes Interesse, wie die Arbeiten von O. Warburg (1), H.von Euler (2) u.a. über das Studium neuer Enzymsysteme der alkoholischen Gärung, der Glykolyse und der Atmungskette zeigen. Immer jedoch ist für die katalytische Wirksamkeit dieser Biokatalysatoren das Vorliegen eines spezifischen Proteins Voraussetzung.

W.Lautsch und Mitarbeiter (3) konnten durch Modellforschung von der synthetischen Seite her zur Klärung wichtiger Wechselbeziehungen zwischen Wirkungsgruppe und Apoferment beitragen. Die besonders an Polypeptidmodellen mit Wirkungsgruppen aus der Chlorophyll- und Häminreihe durchgeführten Untersuchungen zeigten, daß die prosthetische Gruppe durch die Peptidkette eine Aktivierung (4) erfährt. Die Sonderstellung der Peptidkette kam auch durch Zwischenstoffwirkungen mit dem Substrat (5) zum Ausdruck. Die Autoren (6) bewiesen weiterhin für katalytische Vorgänge die Bedeutung der Peptidkonfiguration, wie sie E.Ambrose und Mitarbeiter (7) an Polypeptiden durch röntgen- und infrarotspektroskopische Messungen sowie P.Doty und

Mitarbeiter (8) durch Bestimmung der Rotationsdispersion nachgewiesen hatten. In diesem Zusammenhang war besonders interessant der Nachweis der Energiefortleitung (9) sowohl über die α-Helixform Paulings (10), wie auch über die zufallsgeknäulte ß-Form.

Unter den Gesichtspunkten, daß bei vielen enzymatischen Vorgängen sowohl der Disulfidgruppe (11), wie auch der freien oder substituierten Thiolgruppe (12) besondere biochemische Bedeutung zukommen, erschien es interessant, auch Polypeptide aufzubauen, welche in endständiger und hömöopolarer Bindung das Redoxsystem L-Cystein/L-Cystin enthielten.

In der Diplomarbeit von D.Vollmann, Freie Universität Berlin, 1956 " Ueber die Darstellung L-Cystein substituierter Poly-L-Glutaminsäure" wurde zum ersten Mal über ein derartiges Modell berichtet. Die Synthese erfolgte durch Einbeziehung von L-Cystindimethylester in den Polykondensationsablauf von L-Glutaminsäure-γ-methylester-N-Carbonsäureanhydrid und anschließender Ueberführung des gebildeten Polypeptidmethylesters über das Polyhydrazid in die freie Polypeptidcarbonsäure nach V.Bruckner, sowie J. und K.Kovacs (13).

Die bemerkenswerte Beobachtung, daß S-Benzyl-L-Cysteinbenzylester bei der Initiierung von L-Glu-γ-benzylester-NCA erhebliche Keimbildungsschwierigkeiten zeigte, gab Veranlassung, im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Wirkung verschiedener O,S-substituierter L-Cystein-Initiatoren eingehender zu prüfen. Um vergleichsweise Modelle mit sauren und basischen Aminosäureeinheiten aufzubauen, standen dabei N-Carbonsäureanhydride vom L-Glutaminsäure- und L-Lysin-Typus im Vordergrund der Untersuchung.

Ueber diese Aufgabe hinaus sollte festgestellt werden, wie sich ein über endständiges L-Cystein an eine Polypeptidmolekel gebundener S-Alkyl- bzw. S-Acyl-

rest im Vergleich zu seiner Bindung an die monomere Aminosäure verhält. In diesem Zusammenhang schien die Frage nach Wechselbeziehungen des Schwefels der Wirkungsgruppe mit der Polypeptidkette von Interesse. Durch Vergleich der spektroskopischen Eigenschaften von Modellsubstanzen mit und ohne Schwefel sollte ein Beitrag zur Klärung dieses Problems weiterhin möglich werden.

B. AUSFUEHRUNG

1.) Darstellung O,S-substituierter L-Cystein-Initiatoren und der N-Carbonsäureanhydride.

Die Untersuchungen über die Wirkungsweise der funktionellen Aminogruppe verschiedener O,S-substituierter L-Cysteine gegenüber N-Carbonsäureanhydriden setzten die Darstellung der entsprechenden monomeren Substanzen voraus.

Als Initiatoren beanspruchten hauptsächlich L-Cystein-Derivate mit Methyl-, Benzyl- und Cbzo-Substituenten besonderes Interesse, weil damit gleichzeitig Verbindungen zur Verfügung waren, deren Schutzgruppen sich später vom gebildeten Polypeptid leicht abspalten lassen sollten. Die Tabelle 1 zeigt die Verbindungen in einer Uebersicht.

Tabelle 1

X-S-CH_2-CH(NH$_2$)-COO-Y	X	Y
1. L-Cystindimethyl-ester	-S-CH_2-CH(NH$_2$)-COO-CH_3	-CH_3
2. S-Methyl-L-Cystein-methylester	-CH_3	-CH_3
3. S-Methyl-L-Cystein-benzylester	-CH_3	-CH_2-C_6H_5
4. S-Benzyl-L-Cystein-methylester	-CH_2-C_6H_5	-CH_3
5. S-Benzyl-L-Cystein-benzylester	-CH_2-C_6H_5	-CH_2-C_6H_5
6. S-Cbzo-L-Cystein-methylester	-Cbzo	-CH_3
7. S-Cbzo-L-Cystein benzylester	-Cbzo	-CH_2-C_6H_5

Die erforderlichen S-Alkyl-L-Cysteine wurden nach den üblichen Verfahren aus L-Cystin und Natrium in flüssigem Ammoniak mit anschließender S-Methylierung (14) bzw. S-Benzylierung (15) erhalten. S-Cbzo-L-Cystein konnte gemäß den Angaben von E.Katchalski und Mitarbeitern (16) durch Umsetzung von L-Cystein-HCl mit Cbzo-Chlorid in Bicarbonatlösung bei 0°C dargestellt werden. Interessant ist hierbei, daß die Acyl-

gruppe nicht wie bei S-Acetyl-L-Cystein (17) spontan zur benachbarten primären Aminogruppe wandert, um N-Acyl-L-Cystein zu bilden.

Die Veresterungen erfolgten mit Methanol/Chlorwasserstoff bzw. für die Benzylester über die Stufe der S-substituierten L-Cystein-N-Carbonsäureanhydride durch Aufspaltung dieser mit überschüssigem Benzylalkohol in einer mit trockenem Chlorwasserstoff gesättigten Aetherlösung; eine Methode, welche E.Brand und B.F.Erlanger (18) für die Darstellung anderer Aminosäurebenzylester-Hydrochloride erfolgreich anwandten.

Der Versuch zur Darstellung von L-Cystindibenzylester-2 HCl bedarf einer besonderen Bemerkung. Läßt man auf L-Cystin-di-NCA Benzylalkohol einwirken, so werden zwar die beiden 2,5-Dioxo-oxazolidin-Ringe zum Dibenzylester aufgespalten, aber die außerdem entstandenen Carbaminsäurereste stabilisieren sich durch Abspaltung von 1 Mol Wasser und 1 Mol Kohlendioxyd unter Ausbildung einer Harnstoffgruppierung, welche das Molekül zum Ring schließt. An der Substanz lassen sich weder Hydrochlorid, primäre Aminogruppen, noch freie Carboxylgruppen nachweisen. Das UV-Spektrum zeigt deutlich die Phenylbanden. Das Präparat fällt nach Umkristallisation aus Alkohol in farblosen Nadeln an. Der Schmelzpunkt liegt bei 86°C und die optische Drehung beträgt:

$$[\alpha]_D^{20} = \begin{array}{l} -\ 84{,}2^\circ \text{ (c= 2,5, Methanol)} \\ -\ 32{,}0^\circ \text{ (c= 2,0, Dichloressigsäure)} \\ -117{,}5^\circ \text{ (c= 2,0, Dimethylformamid)} \end{array}$$

Die Analyse ergab, daß die stark hydrophobe Substanz mit Alkohol kristallisiert. In Abb. 1 ist das Kalottenmodell aufgenommen.

Zur Freisetzung der funktionellen Aminogruppe an den L-Cystein-Derivaten erfolgte die Abspaltung des

Hydrochlorids nach den allgemeinen Angaben von J.Hillmann (19) in Chloroform mit trockenem Ammoniak bei 0°C.

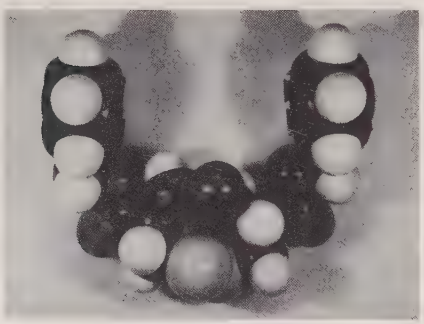


Abb. 1

L-Cystin - di-benzylester-harnstoff.

Von den N-Carbonsäureanhydriden sollten diejenigen des L-Glu-γ-benzylesters, L-Glu-γ-methylesters und ε-N-Cbzo-L-Lysins in Frage stehen. Sie wurden entweder nach A.C. Farthing und R.J. Reynold (20) über das Phosgenverfahren oder nach M.Bergmann (21) über die Leuchssche Methode dargestellt.

Für die Polykondensation wurde als dipolfreies Lösungsmittel sorgfältig von allen, aktive Wasserstoffatome enthaltenden, Verunreinigungen befreites Dioxan verwandt.

2.) Manometrische Messung der Polykondensationen in der Warburg-Apparatur.

Um Kenntnis über die Initiatorwirkung der funktionellen Aminogruppe in Frage stehender L-Cystein-Derivate zu bekommen, wurde unter vergleichbaren Bedingungen mit Hilfe der Warburg-Technik (22) das während der Polykondensation entwickelte CO_2-Gasvolumen manometrisch bestimmt. Die Versuchsbedingungen sollen im folgenden kurz skizziert sein.

Für alle untersuchten Polykondensationen wurde das Molverhältnis Initiator-Aminogruppe/AS-NCA 1:25 angesetzt und das unter Normalbedingungen theoretisch zu erwartende CO_2-Gasvolumen auf 600 mm³ festgelegt. Die erforderliche Menge AS-NCA wurde in das Reaktionsgefäß eingewogen und mit 0,5 ml reinem Dioxan gelöst. Die entsprechende Initiatormenge wurde in den Seitenarm gebracht und mit Dioxan zu insgesamt 0,388 ml ergänzt. Die Temperatur des Thermostaten betrug 40°C. Die Gefäße blieben bei geöffnetem, vor Feuchtigkeit geschütztem Manometer 10 Minuten im Wasserbad. Nach diesem Temperaturausgleich wurden die Hähne geschlossen, die Manometer gekippt und die Polykondensationen gestartet. Die Volumina wurden nach folgender Gleichung (23) auf Normalbedingungen umgerechnet:

$$X = h \left[\frac{V_g \frac{273}{T} + \alpha \cdot V_{fl}}{p_o} \right]$$

X = Gasmenge in mm³ bei Normalbedingungen
h = Druckänderung bei konstantem Volumen
p_o = Normaldruck in Millimeter Sperrflüssigkeit
V_g = Volumen des Gasraums bis zum Meniskus der Sperrflüssigkeit
V_{fl} = Volumen der Lösung
T = Absolute Temperatur des Thermostaten
α = Bunsenscher Absorptionskoeffizient

Infolge des kleinen Wertes von V_{fl} wurde das mit dem Bunsenschen Absorptionskoeffizienten versehene Glied in der Formel bei der Auswertung nicht berücksichtigt. Sämtliche Druckänderungen bei konstantem Volumen wurden mittels Thermobarometer korregiert.

Ueber die genauen Gewichtsmengen der Monomeren pro Reaktionsgefäß unterrichtet Tabelle 2.

Tabelle 2.

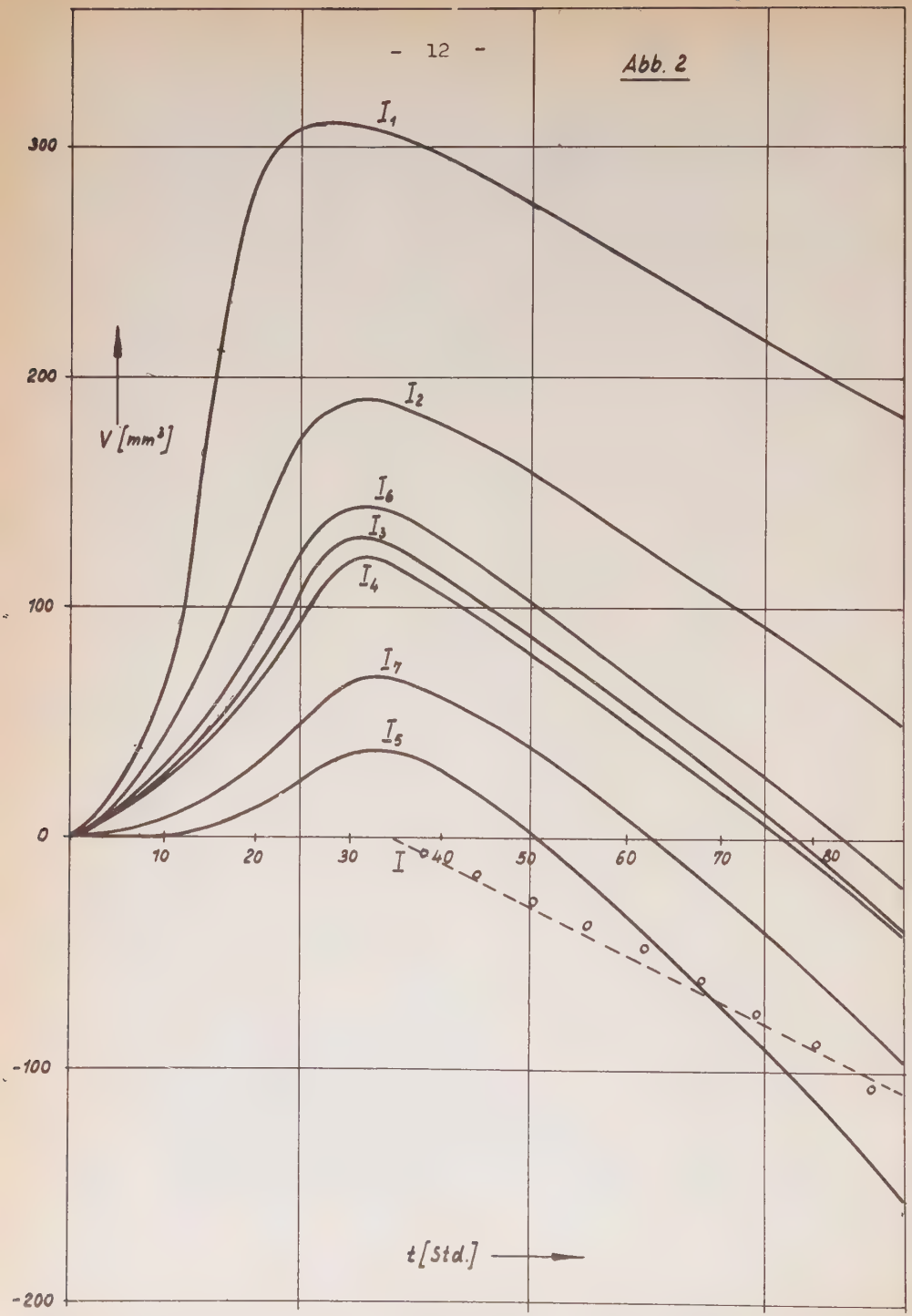
Initiator	Menge in γ
1. L-Cystindimethylester, M: 268,3	143
2. S-Methyl-L-Cysteinmethylester, M: 149,2	159
3. S-Methyl-L-Cysteinbenzylester, M: 225,3	241
4. S-Benzyl-L-Cysteinmethylester, M: 225,3	241
5. S-Benzyl-L-Cysteinbenzylester, M: 301,4	321
6. S-Cbzo-L-Cysteinmethylester, M: 269,3	287
7. S-Cbzo-L-Cysteinbenzylester, M: 345,4	368
N-Carbonsäureanhydrid	**Menge in mg**
I. L-Glutaminsäure-γ-benzylester-NCA, M: 263,2	7,03
II. L-Glutaminsäure-γ-methylester-NCA, M: 187,1	5,00
III. ε-N-Cbzo-L-Lysin-NCA, M: 306,3	8,18

Um für den Polykondensationsablauf zunächst Fällungspolymere auszuschließen, d.h. Polypeptide, welche nach entsprechend langer Kette im Lösungsmittel ausfallen, wurden die geplanten Untersuchungen mit L-Glu-γ-benzylester-NCA begonnen.

Der Abb.2 ist das manometrische Meßergebnis zu entnehmen. Aus den Kurvenverläufen geht trotz Einhaltung gleicher Reaktionsbedingungen sehr deutlich die recht unterschiedliche Initiator-Wirkung der einzelnen O,S-substituierten L-Cystein-Derivate hervor. Während die Polykondensation mit L-Cystindimethylester (Kurve I_1) verhältnismäßig rasch abläuft, das entwickelte Gasvolumen beträgt nach 15 Stunden 190 mm³, fällt dieser Wert für die übrigen Initiatoren beträchtlich ab. Die Reihenfolge geht über S-Methyl-L-Cysteinmethylester (Kurve I_2) 80 mm³, S-Cbzo-L-Cysteinmethylester (Kurve I_6) 55 mm³, S-Methyl-L-Cysteinbenzylester (Kurve I_3) 48 mm³, S-Benzyl-L-Cysteinmethylester (Kurve I_4) 42 mm³, S-Cbzo-L-Cysteinbenzylester (Kurve I_7) 18 mm³ und endet schließlich mit S-Benzyl-L-Cysteinbenzylester (Kurve I_5) 4 mm³. Die Induktionsperioden der beiden zuletzt genannten Initiatoren sind beachtlich.

Recht bemerkenswert ist die Beobachtung, daß die jeweiligen Kurven ein Maximum durchlaufen, um mit annähernd gleicher Neigung wieder abzufallen. Für die Kurve I_1 wird das Maximum nach 26 Stunden Reaktionsdauer, für die Kurve I_5 infolge der beträchtlichen Induktionsperiode wesentlich flacher und mit 33 Stunden auch später erreicht. Die Maxima der übrigen Kurven liegen dazwischen. Interessant ist auch die Kurve I, welche die Meßwerte für das N-Carbonsäureanhydrid ohne Initiator wiedergibt. Man erkennt, daß ihr Verlauf der Forderung entsprechend während der ersten 40 Stunden mit der Abszisse zusammenfällt. Nach diesem Zeitpunkt folgt auch ein Abfall. Die Gasvolumen-Abnahme verläuft jedoch flacher als bei den anderen Kurven. Dieser Vorgang zeigt eine Ueberlagerungsreaktion an.

Abb. 2


I1
I2
I6
I3
I4
I7
I5
300
200
100
0
-100
-200
V [mm³]
10
20
30
40
50
60
70
80
I
t [Std.]

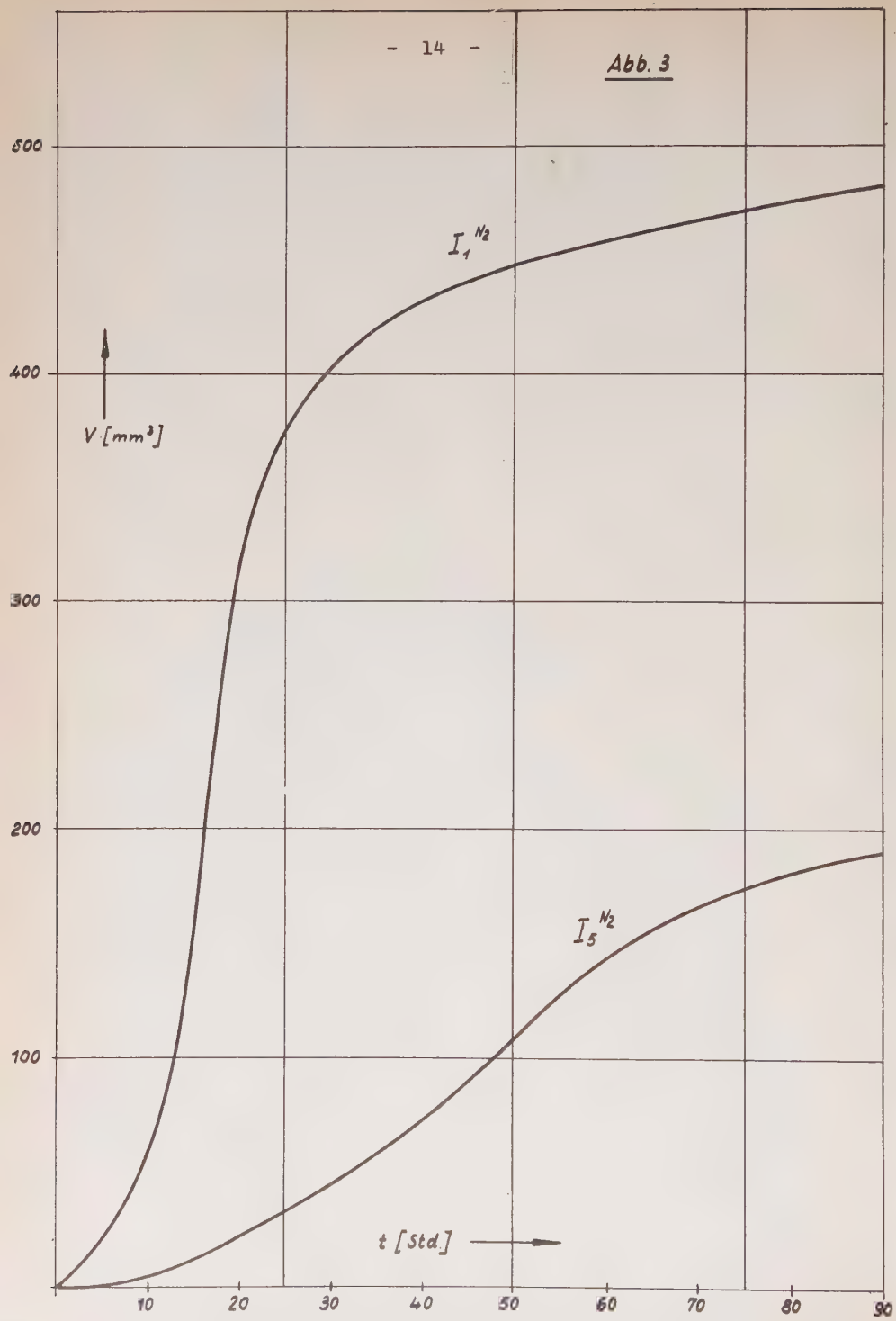
3.) Nachweis katalytischer Sauerstoff-Uebertragung auf Dioxan.

Die Annahme lag nahe, daß der Luftsauerstoff im Manometer auf Dioxan übertragen wird. Die leichte Peroxyd-Bildung des cyclischen Aethers ist bekannt. G.Wittig und G. Pieper (24) konnten z.B. zeigen, daß bei der Oxydation von Dibiphenylenäthylen zu Fluorenon in Dioxan statt der berechneten Menge dreimal so viel Sauerstoff verbraucht wird.

Eine positive Entscheidung in diesem Sinne fiel, als nach Ablauf der Beobachtungsperiode und Fällung der Polymeren im Filtrat mit schwefelsaurer Kaliumjodidlösung Peroxydsauerstoff nachgewiesen werden konnte, eine Reaktion, welche für das reine Lösungsmittel unter vergleichbaren Bedingungen (Thermobarometer) negativ ausfiel. An den Polymeren konnte keine oxydative Veränderung festgestellt werden. Die Oxydationsstufe des Schwefels blieb unverändert, wie positive Reaktionen auf die Disulfid- und S-Acyl-Bindung bewiesen. Die O,S-substituierten L-Cystein-Initiatoren allein vermögen keinen Sauerstoff auf Dioxan zu übertragen.

Zur Ermittlung der tatsächlich entwickelten Kohlendioxyd-Menge wurden die Polykondensationen unter reinstem und sauerstoffreiem Stickstoff, aber sonst gleichen Bedingungen wiederholt. Die Abb.3 unterrichtet über die Ergebnisse für die beiden am meisten von einander abweichenden Initiatoren. Gleichermaßen fällt auf, daß L-Cystin-Dimethylester (Kurve $I_1^{N_2}$) relativ rasch und nahezu quantitativ zum Ablauf der Polykondensation führt. Die Induktionsperiode bei Initiierung mit S-Benzyl-L-Cysteinbenzylester (Kurve $I_5^{N_2}$) bleibt auch hier erhalten. Innerhalb der Beobachtungsperiode kommt es mit diesem Initiator außerdem nur zur Bildung eines begrenzten Anteils Polymerer. Dieses Verhalten erklärt sich zwanglos aus der Ueberlegung heraus, daß nur ein Teil der Initiatormolekeln Polypeptid-

Abb. 3



ketten aufbaut und die Polykondensationsgeschwindigkeit schließlich nur noch von der Wachstumsreaktion bestimmt wird. Ueber die Vorstellungen der Keimbildungshinderung wird noch berichtet. Die Kurven für die Initiierung mit den übrigen Initiatoren liegen zwischen beiden Grenzfällen, die Verhältnisse sind analog.

Die Beziehungen zwischen Polykondensation und Sauerstoffübertragung wurden ferner für einen nicht schwefelhaltigen Initiator geprüft. Kurve $I_O^{N_2}$ der Abb. 4 zeigt den Verlauf bei Initiierung mit vergleichbarer Menge methylalkoholischer Natronlauge unter Stickstoff, während die Verhältnisse unter Luft durch Kurve I_O wiedergegeben werden. Interessant ist die Tatsache, daß der Sauerstoff-Effekt schwächer ausgeprägt ist.

Ein Maß für die Sauerstoffübertragung stellten die Differenzwerte dar, welche sich aus den entsprechenden unter Stickstoff und Luft aufgenommenen Polykondensationskurven leicht ermitteln ließen. Diese indirekte Sauerstoffbestimmung findet ihren Ausdruck in den Kurven der Abb.5. In der Darstellung sind insbesondere die Kurven O_1^D (Initiierung mit L-Cystin-dimethylester) und O_O^D (Initiierung mit methylalkoholischer Natronlauge) miteinander vergleichbar, weil in beiden Fällen nach 40 Stunden die Polykondensation annähernd quantitativ abgelaufen ist. Von dieser Zeit ab fängt nämlich auch das L-Glu-γ-benzylester-NCA an, Sauerstoff zu übertragen. Siehe dazu Kurve I der Abb.2. Eine Korrektur braucht demnach hier nicht zu erfolgen. Die katalytisch übertragene Sauerstoffmenge bezogen auf 10 Stunden beträgt für Kurve O_1^D 40 mm³, während sie für Kurve O_O^D auf 18 mm³ abfällt. Dieser Befund ist recht interessant. Er zeigt, daß die Sauerstoff-Uebertragung doppelt so groß ist, wenn die Polypeptidkette über L-Cystindimethylester als Startsubstanz wächst. Die Kurve O_5^D (Initiierung mit S-Benzyl-L-Cysteinbenzylester) verläuft steiler

Abb. 4

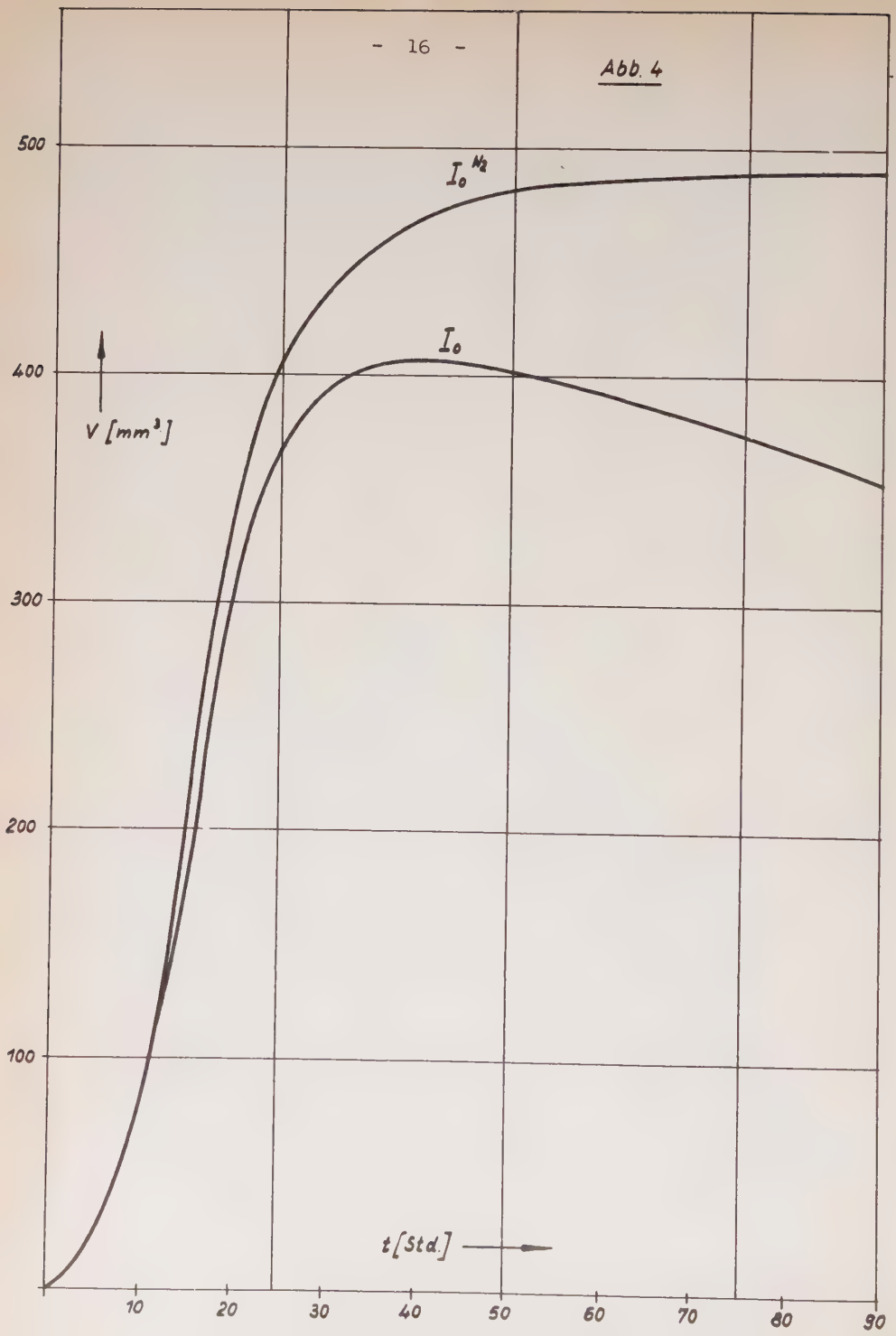
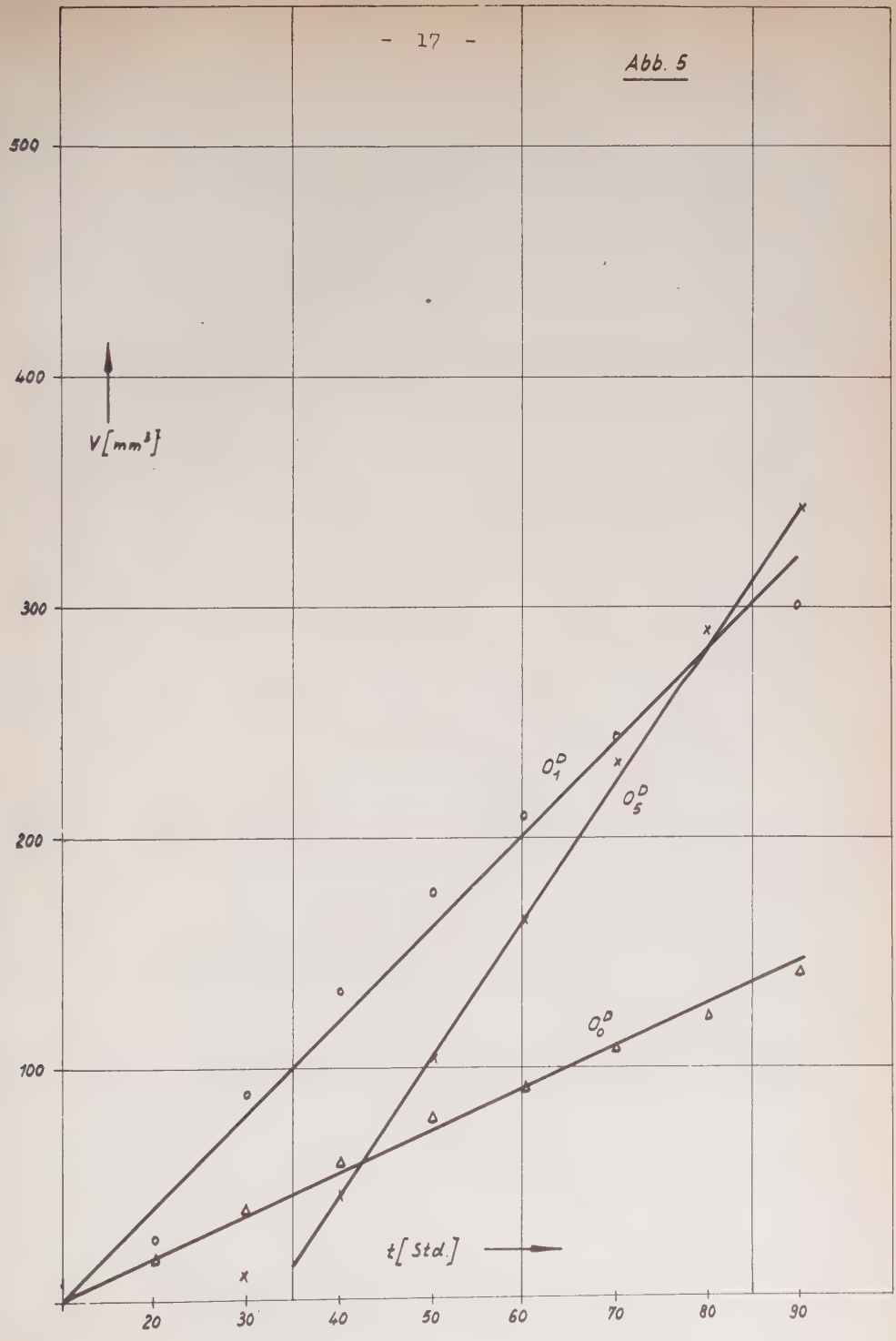


Abb. 5

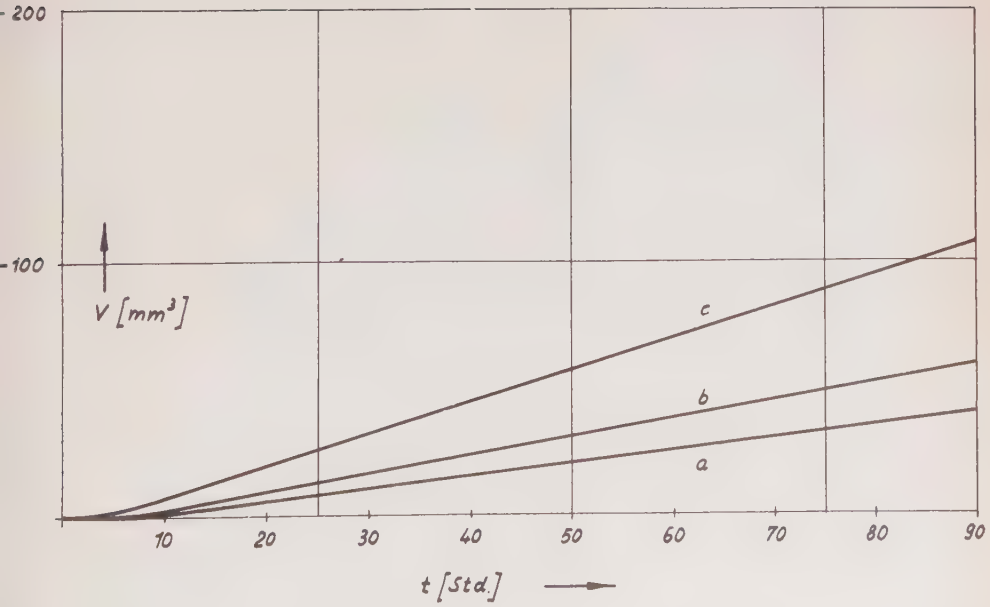


im Anstieg als die Kurve O_1^D. Dies erklärt sich wohl hauptsächlich daraus, daß die Polykondensation infolge der Induktionsperiode (siehe Kurven I_5 und $I_5^{N_2}$ der Abb.2 und 3) später anläuft und außerdem NCA zur Sauerstoffübertragung beiträgt. Wenn man diesen Anteil in Abzug bringt, fällt die Steigung auf die der Kurve O_1^D.

Um zu entscheiden, ob die wachsende oder bereits ausgebildete Polypeptidkette die Autoxydation des Dioxans wirksamer katalysiert, wurde aufgearbeitetes Polypeptid in Dioxan wieder gelöst, und die Sauerstoffübertragung verfolgt. Alle Bedingungen blieben gleich. Das Ergebnis bringt die Abb.6. Die vergleichbaren Einwaagen pro Reaktionsgefäß betragen für Poly-L-Glutaminsäure-γ-benzylester (Kurve a) 5,86 mg, für L-Cystin-N,N'-Bis-Poly-L-Glutaminsäure-γ-benzylester (Kurve b) 5,86 mg und für L-Cystin-N,N'-Bis-Poly-L-Glutaminsäure-γ-benzylester-L-Phenylalanin 2:1 als copolymeres Modell (Kurve c) 5,23 mg. Die katalytische Sauerstoffübertragung ist in allen Fällen geringer als bei den entsprechenden Polykondensationen. Aber ebenso ist eine Erhöhung der Katalyse feststellbar, wenn die L-Cystin-Endgruppe in der Polypeptidmolekel auftritt. Von weiterem Interesse ist der Befund, daß durch Einstreuung von Phenylalanin-Einheiten in die Polypeptidkette eine Steigerung der Sauerstoffübertragung um das Doppelte erreicht wird. Vergleiche die Kurven c und b.

Die Beobachtung, daß L-Glu-γ-benzylester-NCA nach 40 Stunden zur Sauerstoffübertragung fähig wird, läßt eine vorherige Aktivierung der Molekel vermuten. Hierzu besitzen Beobachtungen über das Verhalten von L-Glu-γ-benzylester-NCA in wasserfreier Dichloressigsäure Bedeutung. Es konnte gezeigt werden, daß sich das NCA ohne CO_2-Abspaltung in DCE 5 Minuten lang auf 130-140°C erwärmen läßt. Die anfangs farblose Lösung wird gelb. Nach

Abb. 6



Abkühlung und Zusatz von absolutem Aether und Petroläther kristallisiert das NCA wieder in farblosen, kleinen, zu Büscheln verwachsenen Nadeln aus. Der Schmelzpunkt bleibt unverändert 95-96°C. Steigert man dagegen die oben genannte Temperatur auf 145-155°C, hält aber die übrigen Bedingungen gleich, so färbt sich die Lösung intensiver gelb. Auch hier tritt keine Kohlendioxydentwicklung auf. Diese setzt erst bei Erhitzen auf 165-170°C ein. Nach gleicher Aufarbeitung kristallisieren lange farblose Nadeln aus, welche sich aber merkwürdigerweise nicht mehr isolieren lassen, selbst wenn der Versuch unter Stickstoff ausgeführt wird. Sobald diese Kristalle mit dem Spatel oder dem Glasstab berührt werden, fallen sie in sich zusammen und ergeben amorphe Schmieren. Teilweise, aber in sehr geringem Maß, spalten sich CO_2-Bläschen ab. Mit warmem Wasser setzt spontan CO_2-Entwicklung ein. Man geht in der Annahme wohl kaum fehl, daß das NCA hier in einem angeregten Zustand vorliegt.

Auch in Dioxan bei 40°C scheint sich nach bestimmter Zeit (ab 40 Stunden, siehe Kurve I Abb.2) ein ähnlicher Zustand auszubilden. Diese Annahme wird noch durch folgendes Verhalten gestützt. Zieht man nämlich nach 96 Stunden mit Ende der Beobachtungsperiode das Dioxan im Vakuum ab, so verbleibt ein kristalliner Rückstand, welcher bei 82-84°C schmilzt und sich bei dem Versuch der Umkristallisation aus Benzol/Tetrachlorkohlenstoff unter CO_2-Entwicklung zersetzt. Auch nach Aufbewahren über mehrere Tage im Vakuum-Exsiccator findet eine Veränderung statt, wobei Polymere entstehen.

In dem folgenden Abschnitt werden Polykondensationen beschrieben, welche zu Fällungspolymeren führen. Die Abb. 7 zeigt die Ergebnisse der entsprechenden Versuche mit L-Glu-γ-methylester-NCA unter Stickstoff und Luft. Man sieht, daß hier der Poly-Kondensationsablauf

Abb. 7

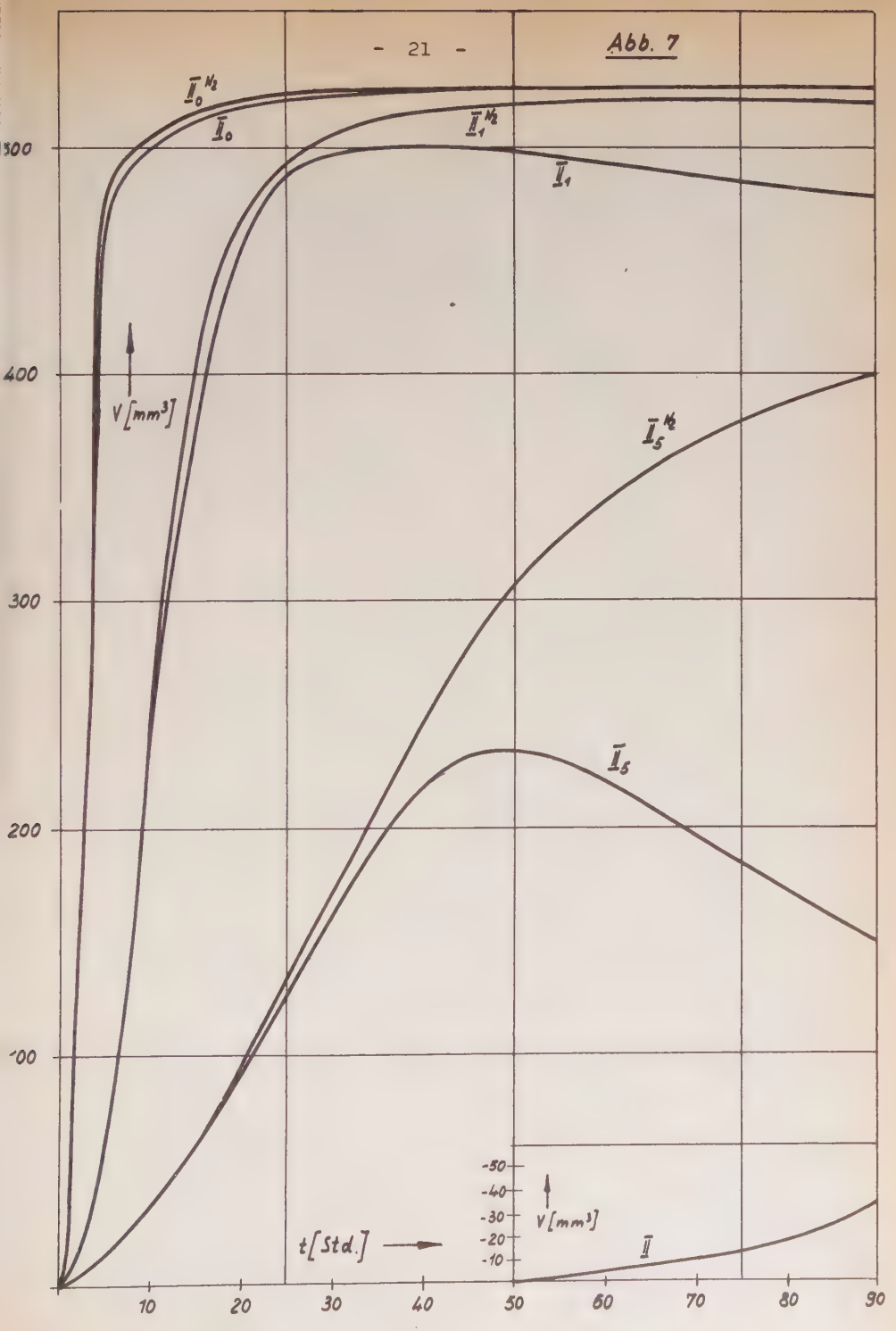
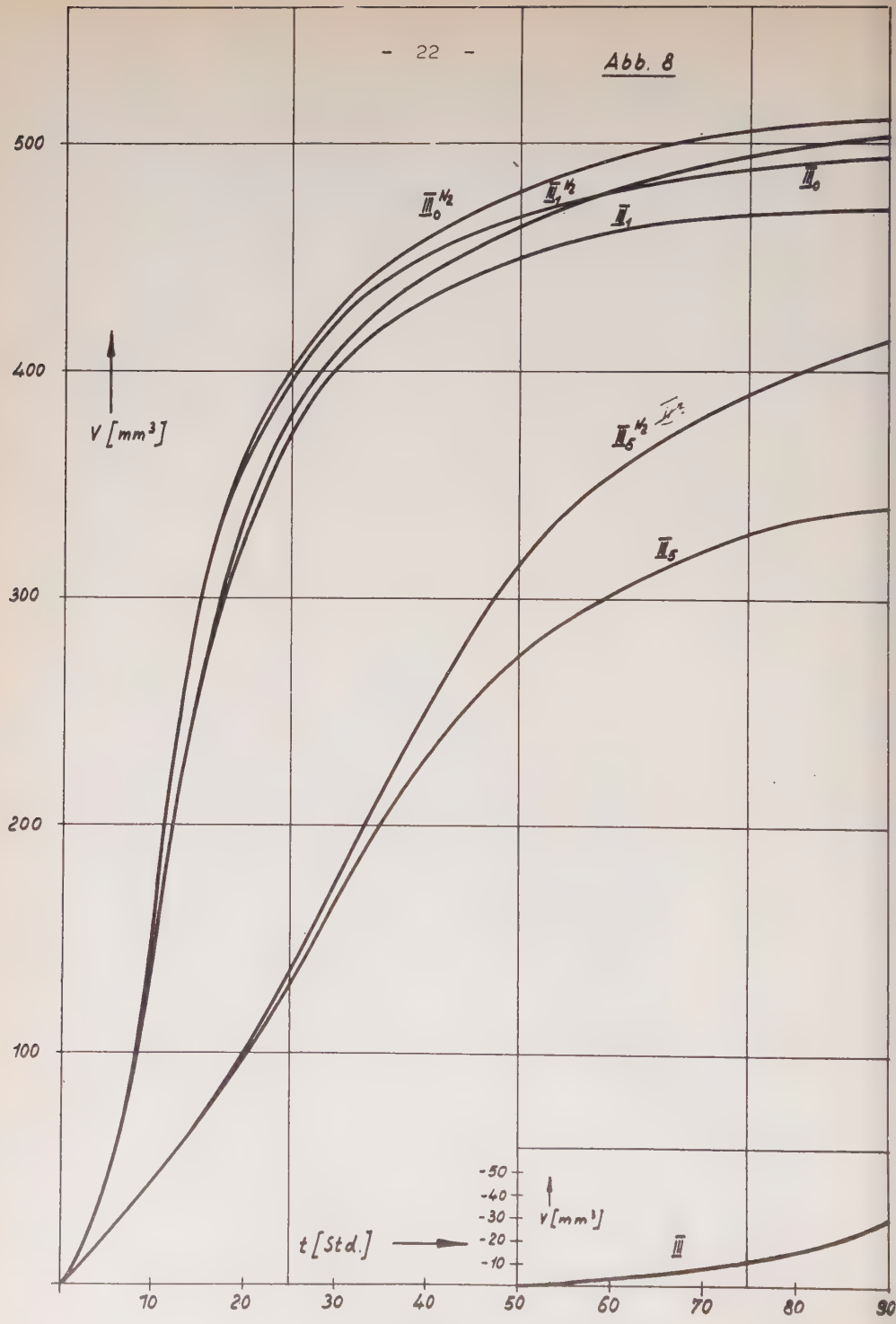

$\bar{I}_0^{M_2}$
$\bar{I}_0$
$\bar{I}_1^{M_2}$
$\bar{I}_1$
$\bar{I}_5^{M_2}$
$\bar{I}_5$
$\bar{I}$
V [mm³]
t [Std.]
500
400
300
200
100
10
20
30
40
50
60
70
80
90
-50
-40
-30
-20
-10

Abb. 8


500
400
300
200
100
V [mm³]
II₀½
II₁½
II₀
II₁
II₅½
II₅
t [Std.]
-50
-40
-30
-20
-10
V [mm³]
III
70
20
30
40
50
60
70
80
90

mit methylalkoholischer Natronlauge außergewöhnlich schnell erfolgt. Beide Kurven ($II_o^{N_2}$ und II_o) sind nahezu identisch und die Sauerstoffübertragung praktisch Null. L-Cystindimethylester (Kurven $II_1^{N_2}$ und II_1) initiiert gleichfalls sehr rasch. Es kommt jedoch zur Peroxydbildung im Lösungsmittel. S-Benzyl-L-cystein-Benzylester (Kurven $II_5^{N_2}$ und II_5) stößt die Polykondensation vergleichsweise langsam an. Die katalytische Sauerstoffübertragung ist wesentlich erhöht. Der Tatsache, daß es bei diesen Polykondensationen schneller oder langsamer zur Ausscheidung von Polymeren kommt, muß allerdings bei dem Vergleich der katalytischen Wirksamkeit Rechnung getragen werden, denn die suspendierten Poly-L-Glu-γ methylester sind nicht mehr katalytisch wirksam. Das L-Glu-γ- methylester-NCA allein (Kurve II) überträgt verhältnismäßig spät und wenig Sauerstoff.

Die Ergebnisse über die Wirkungsweise der verschiedenen Initiatoren gegenüber ε-N-Cbzo-L-Lysin-NCA bringt die Abb.8. Die Befunde sind ähnlich wie für L-Glu-γ-methylester-NCA. Auch hier entstehen Fällungspolymere. Die Polykondensationsgeschwindigkeit ist bei Initiierung mit S-Benzyl-L-Cysteinbenzylester (Kurven $III_5^{N_2}$ und III_5) wieder am langsamsten, die katalytische Sauerstoffübertragung am stärksten. Bei Initiierung mit L-Cystindimethylester erhält man die Kurven $III_1^{N_2}$ und III_1. Mit methylalkoholischer Natronlauge kommt man zu den Kurven $III_o^{N_2}$ und III_o. Die Kurve III zeigt die Sauerstoffübertragung für das NCA. Die unlöslichen Polymeren übertragen keinen Sauerstoff.

4.) Deutung der unterschiedlichen Wirkungsweise O,S-substituierter L-Cystein-Initiatoren.

Nach den vorliegenden Ergebnissen über die Polykondensationen der N-Carbonsäureanhydride des L-Glu-γ-benzylesters, L-Glu-γ-methylesters und des ε-N-Cbzo-L-Lysins unterscheidet sich die Wirkungsweise der einzelnen O,S-substituierten L-Cystein-Initiatoren recht beachtlich. Besonders

fällt dabei auf, daß trotz gleicher Konzentration an freien Aminogruppen L-Cystin-dimethylester und S-Benzyl-L-Cysteinbenzylester die stärksten Abweichungen voneinander zeigen. Während jener Initiator innerhalb der Beobachtungsperiode schnell und quantitativ zum Ablauf der Polykondensation führt, geht dem letzteren diese Eigenschaft weitgehend verloren. Die übrigen L-Cystein-Derivate nehmen mehr oder weniger eine Mittelstellung ein.

Für die aktive Reaktionsweise des L-Cystindimethylesters lag zunächst der Gedanke zu Grunde, daß die Polykondensation möglicherweise über R-S-Radikale eingeleitet wird. Entsprechende Versuche mit N,N'-Diacetyl-L-Cystindimethylester als Initiator blieben jedoch erfolglos und schließen diese Annahme aus. Ebenso ließ sich eine ionische Aufspaltung der Disulfidbindung nicht nachweisen. Mithin ist das aktivierende Prinzip in den Methylestergruppen, aber offensichtlich auch in der Disulfidbindung zu suchen. Man kann diese wohl als eine Art Anhydridbindung aus Merkaptan und Sulfensäure auffassen. Das Molekül ist demnach nicht resonanzstabilisiert. Es wäre anderenfalls auch schwer zu verstehen, warum S-Methyl-L-Cysteinmethylester nicht in gleicher Weise die Polykondensation zum Ablauf bringt. Eine sterische Hinderung als Möglichkeit unterschiedlicher Wirkung dürfte in beiden Fällen entfallen.

Die Sonderstellung der Säureanhydridbindung als Aktivator kommt auch bei der Initiierung mit S-Cbzo-L-Cysteinmethylester und S-Cbzo-L-Cysteinbenzylester zum Ausdruck. Beide Initiatoren stoßen die Polykondensation mit kleineren Induktionsperioden an als die entsprechenden stärker resonanzstabilisierten Ester des S-Benzyl-L-Cysteins.

Die Wirkungsweise von S-Benzyl-L-Cystein-benzylester insbesondere mit L-Glu-γ-benzylester-NCA wird verständlicher, wenn man im Sinne von G.Briegleb (25) die

Bildung von π -Komplexen des Initiators mit dem NCA annimmt. Eine Veranschaulichung gibt die Abb.9.

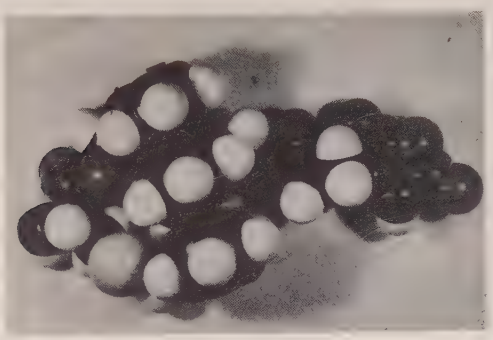


Abb.9 π-Komplex von S-Benzyl-L-Cysteinbenzylester mit L-Glu-γ-benzylester-NCA.

Diese Annahme findet weiterhin eine Stütze dadurch, daß S-Benzyl-L-Cysteinbenzylester die Polykondensation von L-Glu-γ-methylester-NCA wesentlich günstiger einleitet. Allerdings sind auch hier π-Komplexe zwischen den Benzolkernen des Initiators zu erwarten, aber eine Einbeziehung des N-Carbonsäureanhydrids wird ausgeschlossen. Die Abb.10 bringt es zum Ausdruck.

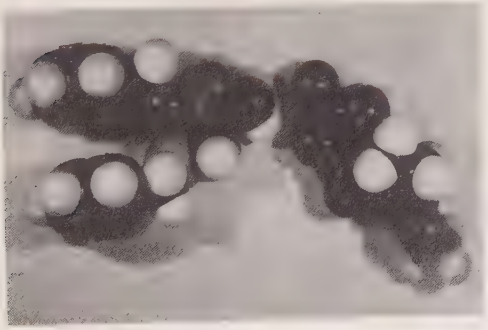


Abb.10

S-Benzyl-L-Cysteinbenzylester mit L-Glu-γ-methylester-NCA.

Schließlich sollen auch die spektralen Eigenschaften der O,S-substituierten L-Cystein-Derivate zur Diskussion gestellt werden. Sie stellen mit einen Anhaltspunkt für die unterschiedliche Initiatorwirkung dar. Die Abb.11 und 12 bringen die UV-Absorptionsspektren zwischen 240 - 300 nm für die Hydrochloride von:

S-Methyl-L-Cystein-benzylester	Kurve: -3-
S-Benzyl-L-Cystein-methylester	-4-
S-Benzyl-L-Cystein-benzylester	-5-
S-Cbzo-L-Cystein-methylester	-6-
S-Cbzo-L-Cystein-benzylester	-7-

ferner für:

L-Cystin-di-benzylester-harnstoff	-8-
L-Glutaminsäure-γ-benzylester	-9-

Die Aufnahmen erfolgten in methanolischer Lösung, die Konzentration betrug 10^{-3}m.

Der spektrale Vergleich von S-Cbzo-L-Cystein-benzylester (Kurve 7, Abb.11) mit S-Benzyl-L-Cystein-benzylester (Kurve 5, Abb.11) bestätigt deutlich das unterschiedliche Verhalten beider Initiatoren. Während S-Cbzo-L-Cysteinbenzylester ein UV-Absorptionsspektrum mit vier Phenylbanden bei 268, 263, 257,5 und 251,8 zeigt, entfallen für S-Benzyl-L-Cysteinbenzylester die Maxima bei 251,8 und 257,5 mm. Außerdem verschiebt sich das Maximum von 263 nm auf 261,3 nm nach kürzerer Wellenlänge hin. Die Intensitäten sind recht verschieden.

Ebenso ist auch der Vergleich der Spektren von S-Benzyl-L-Cysteinmethylester (Kurve 4, Abb.11) und S-Methyl-L-Cysteinbenzylester (Kurve 3, Abb.12) aufschlußreich. In beiden Fällen handelt es sich um annähernd gleiche Moleküle, welche sich eben nur durch den Austausch der Methyl-und Benzyl-Substituenten am Sauerstoff bzw. Schwefel des L-Cysteins unterscheiden.

Während S-Methyl-L-Cysteinbenzylester das gleiche Spektrum wie S-Cbzo-L-Cysteinmethylester (Kurve 6, Abb.11) zeigt und sich beide vom UV-Absorptionsspektrum eines nicht

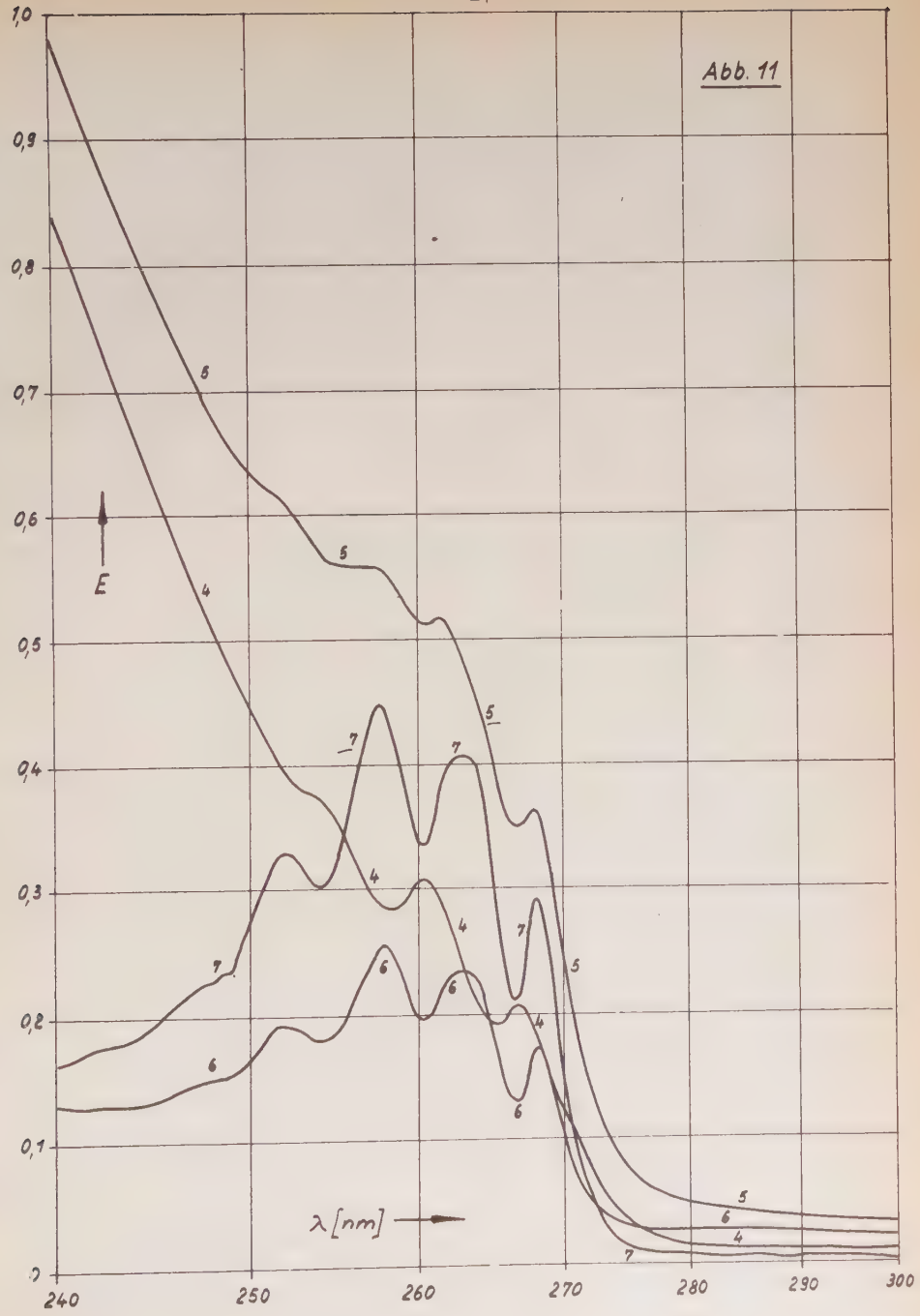


Abb. 11
1,0
0,9
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
E
λ [nm]
240
250
260
270
280
290
300
4
5
6
7

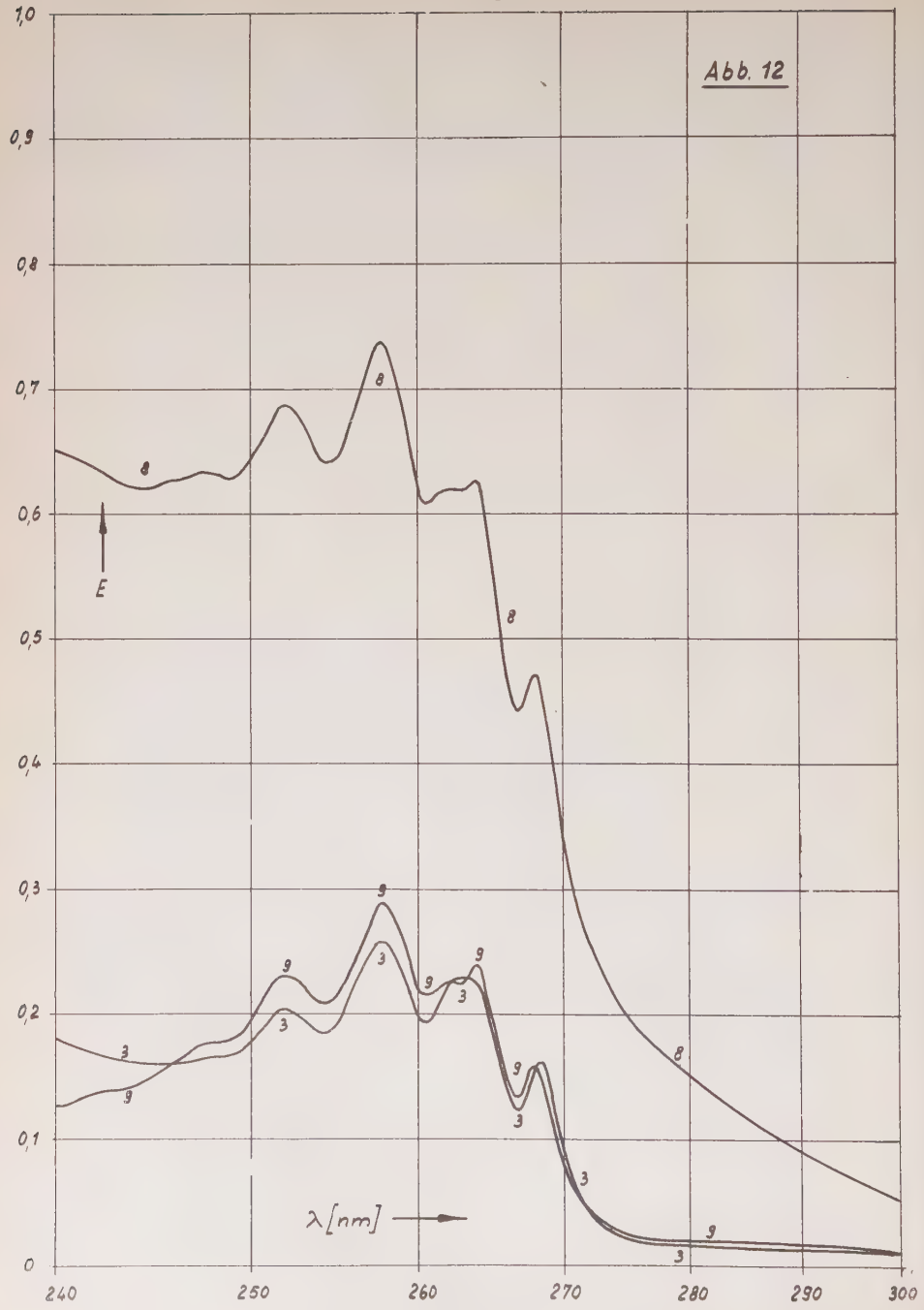


Abb. 12
1,0
0,9
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
E
λ[nm]
240
250
260
270
280
290
300

schwefelhaltigen AS-Benzylesters - wie z.B. L-Glu-γ-benzylester - nur im Gebiet der Wellenlängen von 262,0 - 264,7 unterscheiden,ist das Spektrum von S-Benzyl-L-Cysteinmethylester wesentlich verändert.Auch hier treten wie bei S-Benzyl-L-Cysteinbenzylester nur noch zwei nennenswerte Maxima auf.Sie liegen noch weiter nach dem kurzwelligeren Gebiet verschoben bei 266,5 und 260,3 nm.Die Intensitäten sind wieder verschieden.Das spektrale Verhalten der S-Benzyl-Gruppe läßt eine verstärkte Wechselwirkung zwischen dem Phenylrest und dem Schwefelatom über die Methylengruppe hinweg erkennen.

Die Kurve 8 der Abb.12 zeigt das Spektrum für L-Cystin-di-benzylester-harnstoff.

5.) Das chemische Verhalten von S-Alkyl- und S-Acyl-Endgruppen an L-Cystein substituierten Polypeptiden auf L-Glutaminsäure- und L-Lysin-Basis.

Auf Grund der bisherigen Untersuchungen lassen sich Aussagen über die Wirkungsweise verschiedener O,S-substituierter L-Cystein-Initiatoren gegenüber Aminosäure-N-Carbonsäureanhydriden machen.Im folgenden beanspruchen Versuche Interesse,welche sich mit der Abspaltung von S-Benzyl- und S-Cbzo-Gruppen beschäftigen,wenn sie über L-Cystein mit einer Polypeptidkette verbunden sind.

Bekanntlich erfolgt die Abspaltung der S-Benzyl-Gruppe von S-Benzyl-L-Cystein und S-Benzyl-L-Cysteinpeptiden nach V.du Vigneaud,R.H.Sifferd und G.L. Miller (26) sehr leicht in flüssigem Ammoniak mit Natrium.Auch in Eisessig läßt sich mit Phosphoniumjodid die S-Benzyl-Bindung von S-Benzyl-L-Cystein nach C.R. Harington und T.H. Mead (27) erfolgreich lösen.Beide Methoden ermöglichen in großer Anwendungsbreite und glatter Reaktion gleichzeitig noch die Abspaltung von N-Cbzo- und O-Benzylestergruppen.Diese Verfahren wurden zur Freisetzung funktioneller Gruppen von S-Benzyl-L-Cystein substituierter Poly-L-Glutaminsäure und

S-Benzyl-L-Cystein-benzylester substituiertem Poly-ε-N-Cbzo-L-Lysin herangezogen.Erstere Verbindung wurde aus dem entsprechenden Polypeptidmethylester über alkalische Verseifung in Gegenwart von $Cu(CH)_2$ nach V. Bruckner sowie J. und K. Kovacs (28) gewonnen.

Das in einer Reihe von Versuchen erhaltene Ergebnis über die Reaktionsbereitschaft der S-Benzyl-Gruppe dieser Modellsubstanzen ist recht bemerkenswert.So konnte in keinem der Beispiele die endständige Benzyl-thio-äther-Bindung aufgespalten werden.Auch nach längerer Einwirkung von überschüssigem Natrium bzw. Phosphoniumjodid versagt die Reaktion und in allen Fällen werden die Präparate hinsichtlich der S-Benzyl-Gruppe unverändert zurück erhalten.

In diesem Zusammenhang sei erwähnt,daß auch E. Katchalski und Mitarbeiter (16) bei der Darstellung von Poly-L-Cystein aus Poly-S-Benzyl-L-Cystein über die vergebliche Abspaltung der S-Benzyl-Gruppen berichten.Sie stellten deshalb Poly-S-Cbzo-L-Cystein dar,an welchem ihnen die Abspaltung der S-Cbzo-Gruppen sowohl in flüssigem Ammoniak mit Natrium als auch in Dichloressigsäure mit Phosphoniumjodid gelang.Die Anwendung der zuletzt genannten Methode führte jedoch zu einem beachtlichen Schwefelverlust infolge gleichzeitiger Abspaltung von Schwefelwasserstoff.Aber auch die S-Cbzo-Gruppe des Poly-S-Cbzo-L-Cysteins besitzt im Vergleich zum S,N-Di-Cbzo-L-Cystein eine erheblich verminderte Reaktionsbereitschaft.So konnten die Autoren zeigen,daß bei Behandlung des S-Cbzo-Poly-L-Cysteins mit konzentriertem Ammoniak über mehrere Tage keine SH-Gruppe freigesetzt wird,während an S,N-Di-Cbzo-L-Cystein bereits verdünnter Ammoniak den S-Cbzo-Rest quantitativ abspaltet.Die Behandlung des Polymeren in einer Pyridinlösung mit Diäthylamin bei 80°C blieb auch erfolglos.An S-Cbzo-L-Cystein-methylester substituiertem Poly-L-Glutaminsäure-γ-methylester und S-Cbzo-L-Cystein-benzylester substituiertem Poly-ε-N-Cbzo-L-Lysin verhält sich die endständige S-Cbzo-Gruppe vollkommen analog.

Nach den hier erörterten Untersuchungen beobachtet man demnach an den Polypeptiden, für die Benzyl-thio-äther-Bindung besonders stark, für die S-Cbzo-Bindung schwächer ausgeprägt, eine beachtliche Umkehr des an den entsprechenden Monomeren festgestellten chemischen Verhaltens. Dieser auffällige Befund deutet daraufhin, daß für das chemische Verhalten der Polymeren neben strukturellen Gründen wohl offensichtlich auch Wechselbeziehungen polarer Art zwischen Schwefel und Polypeptidkette bestimmend sein müssen. Es wäre sonst recht schwer zu verstehen, warum im gleichen Versuch N-Cbzo- und O-Benzylester-Gruppen abspaltbar sind.

Ueberblickt man die vorliegenden Ergebnisse, so wird der Aufbau von endständig L-Cystein substituierten Polypeptiden außer von der Reaktivität der verwendeten O,S-substituierten L-Cystein-Initiatoren auch gleichzeitig noch von der Reaktionsbereitschaft der mit der Polypeptidkette verbundenen Schwefelschutzgruppe maßgeblich bestimmt.

In diesem Zusammenhang soll noch ein Befund mitgeteilt werden, welcher die hemmende Wirkung einer Poly-L-Glutaminsäure- und Poly-D,L-Alanin-Kette auf die S-Acetyl-Endgruppe zum Ausdruck bringt.

Läßt man S-Acetyl-L-Cystein-N-Poly-L-Glutaminsäure als Natrium- oder Kaliumsalz bei pH 8,7 (elektrometrische Einstellung der Boratpufferlösung), 20°C und einer Konzentration von 10 γ S/ml (22 mg Polypeptid in 10 ml Lösung) 48 Stunden lang stehen, so kann man mit Hilfe der verzögerten Nitroprussidreaktion nach F. Lynen (12) colorimetrisch noch 95 % der zu Anfang gemessenen S-Acetylgruppen nachweisen. Freie SH-Gruppen oxydieren sich sehr rasch durch Luftsauerstoff und stören den Nachweis nicht. Siehe dazu die Kurve 1 der Abb. 13, welche den S-Acetyl-Gehalt in Abhängigkeit zur Zeit wiedergibt. Sowohl für S-Acetyl-α-L-Glutaminyl-L-Cystein (Kurve 2) wie auch für S-Acetyl-Glutathion (Kurve 3) tritt unter vergleichbaren Bedingungen innerhalb der Beobachtungsperiode ein S-Acetyl-Gruppen-Verlust auf. Interessant ist ferner die Tatsache, daß ein Zusatz der entsprechenden Menge Poly-α-L-Glutaminsäure

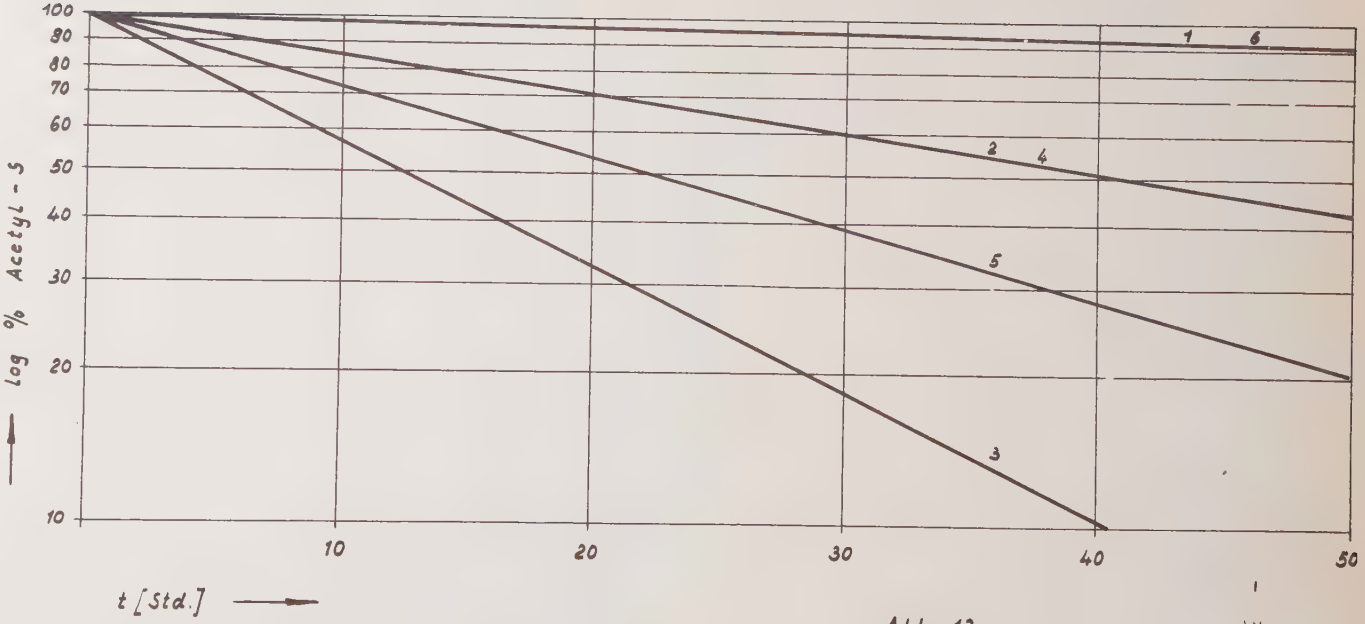

100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
log % Acetyl - S
10
20
30
40
50
t [Std.]
1
6
2
4
5
3

Abb. 13

zu S-Acetyl-α-L-Glutaminyl-L-Cystein das Ergebnis der S-Acetylabspaltung nicht beeinflußt (Kurve 4 fällt mit Kurve 2 zusammen),wohl aber bei S-Acetyl-Glutathion (Kurve 5),welches jetzt die S-Acetyl-Gruppe verzögert verliert. Ein Zusatz von Poly-D,L-Alanin ändert in beiden Fällen das Ergebnis nicht,Es scheint sehr wahrscheinlich und die Ursache für dieses Verhalten zu sein,daß im Falle des S-Acetyl-Glutathions durch Poly-α-L-Glutaminsäure eine teilweise Transpeptidierung stattfindet.Das S-Acetyl-L-Cystein-N-Poly-D,L-Alanin verhält sich analog wie S-Acetyl-L-Cystein-N-Poly-α-L-Glutaminsäure-Natriumsalz. Die Polypeptidkette wirkt bei pH 8,7 hemmend auf die S-Acetyl-Ab-spaltung (Kurve 6).

Die Darstellung der S-Acetyl-Präparate erfolgte mit kleinen Abänderungen,im wesentlichen aber nach den Angaben von Th. Wieland und H.Köppe (17) in pyridin-wässriger Lösung unter Stickstoff mit S-Acetyl-thiophenol.Näheres siehe im experimentellen Teil.

Für S-Acetyl-L-Cystein-N-Poly-α-L-Glutaminsäure ist schließlich noch folgende Beobachtung sehr bemerkenswert.Bei der Aufarbeitung dieser Substanz wurde das überschüssige S-Acetyl-thiophenol und entstandene Thiophenol durch mehrfaches Extrahieren mit Aether im Perforator abgetrennt und das Polypeptid schließlich aus Bicarbonatlösung mit HCl mehrfach umgefällt.Am Ende wurde mit Wasser, Alkohol und Aether gründlich gewaschen.Trotz dieser Operationen gelang es nicht,ein vollkommen Thiophenolgeruchfreies Präparat zu erhalten.Die S-Acetyl-L-Cystein-N-Poly-α-L-Glutaminsäure löst sich als Natriumsalz im Puffer bei pH 8,7 vollkommen klar auf und man kann einwandfrei die colorimetrische S-Acetylbestimmung ausführen. Aber nach ca. 15 - 20 Stunden beobachtet man eine zunehmende milchige Trübung,welche sich noch erheblich steigert. Schließlich wird ein Punkt erreicht,wo die Lösung wieder klar wird und sich ein kristalliner Bodenkörper absetzt. Die S-Acetyl-Bestimmung der Lösung zeigt keine nennenswerte Veränderung gegenüber der Ausgangsbestimmung.Der

isolierte Bodenkörper schmilzt bei 61°C und läßt sich einwandfrei als Diphenyldisulfid identifizieren. Demnach wird von der Poly-α-L-Glutaminsäure Thiophenol eingeschlossen, vom Luftsauerstoff oxydiert und schließlich als Disulfid ausgefällt.

6.) Spektroskopische Eigenschaften von Polypeptiden des L-Lysin-Typus mit und ohne L-Cystin-Wirkungsgruppe.

In der folgenden Abhandlung werden UV- und IR-Absorptionsspektren von Poly-L-Lysin-peptiden mit und ohne L-Cystin-Wirkungsgruppe beschrieben. Dabei wird der Versuch unternommen, durch Vergleich der spektralen Eigenschaften Wechselbeziehungen der Disulfid-Gruppe mit der Polypeptid-Kette sichtbar werden zu lassen.

Die erforderlichen Präparate waren unter Einhaltung vergleichbarer Bedingungen über die Polykondensation von ε-N-Cbzo-L-Lysin-NCA mit L-Cystindimethylester bzw. methylalkoholischer Natronlauge leicht zugänglich. Die anschließend folgende Schutzgruppenabspaltung konnte ohne Veränderung der Disulfidbindung sehr glatt in flüssigem Schwefeldioxyd mit Bromwasserstoff bei Temperaturen zwischen - 60 bis - 65°C erreicht werden. Diese präparative Methode verwendeten bereits E.R. Blout und M. Idelson (29) erfolgreich zur Abspaltung von O-Benzylestergruppen an Poly-L-Glutaminsäure-γ-benzylester.

Während die schwefelhaltigen und schwefelfreien Poly-ε-N-Cbzo-L-Lysine infolge ihrer ungünstigen Löslichkeitseigenschaften für Aufnahmen im UV-Absorptionsgebiet ungeeignet sind, lassen sich die entsprechenden Poly-L-Lysin-Hydrobromide in methanolischer Lösung sehr gut vermessen. Erwartungsgemäß erhält man nach vollständiger Schutzgruppenabspaltung einen maximafreien Kurvenzug, der zunächst noch wenig Aussagen zuläßt. Die Verhältnisse werden anders, sobald man teilweise mit N-Cbzo-Gruppen substituiertes Poly-L-Lys·HBr

aufnimmt und die Phenylbanden betrachtet.

Die Abb.14 zeigt das UV-Absorptionsspektrum von Poly-ε-N-Cbzo-L-Lysin mit (Kurve 1) und ohne (Kurve 2) L-Cystin-Wirkungsgruppe,wenn die Schutzgruppenabspaltung in flüssigem SO_2 mit HBr nach 1 Stunde abgebrochen wird (Reaktionsbedingungen siehe experimentellen Teil) und die jeweils vorliegenden Substanzen nach Aufarbeitung so oft umgefällt werden bis keinerlei Benzylbromidverunreinigungen mehr anhaften.

Die fünf Phenylbanden bei 252,0 / 257,5 / 262,0 / 264,0 und 268,0 nm lassen deutlich erkennen,daß über die Seitenketten noch N-Cbzo-Gruppen gebunden sind.Beide Kurven verlaufen hinsichtlich der Lage ihrer Maxima völlig identisch.Auffällig bleibt nur,daß sich die Höhen der Intensitäten beachtlich voneinander unterscheiden.Es tritt kein Trübungseffekt auf.Da für beide Präparate außer den Reaktionsbedingungen zu ihrer Darstellung auch alle Voraussetzungen zur Aufnahme des Spektrums gleich sind und der Wirkungsgruppenanteil gegenüber der Einwaage verschwindend gering bleibt,folgt aus der Betrachtung der beiden Kurven,daß die schwefelfreie Verbindung weniger N-Cbzo-Gruppen enthält als die schwefelhaltige.Mit anderen Worten ausgedrückt,bei der letzteren verläuft die Schutzgruppenabspaltung ungünstiger.

Hierzu in Widerspruch stehen aber die für Brom und Stickstoff identisch gefundenen Analysenwerte,welche in Tabelle 3 aufgeführt sind.Sie bestätigen im Gegenteil die quantitative Uebereinstimmung beider Präparate,was zur Folge hat,daß auch die Anzahl der N-Cbzo-Gruppen gleich sein muß.

Tabelle 3

	Präparat mit L-Cystin-Wirkungsgruppe	Präparat ohne L-Cytin-Wirkungsgruppe
Br:	22,96 %	23,27 %
N :	11,44 %	11,40 %

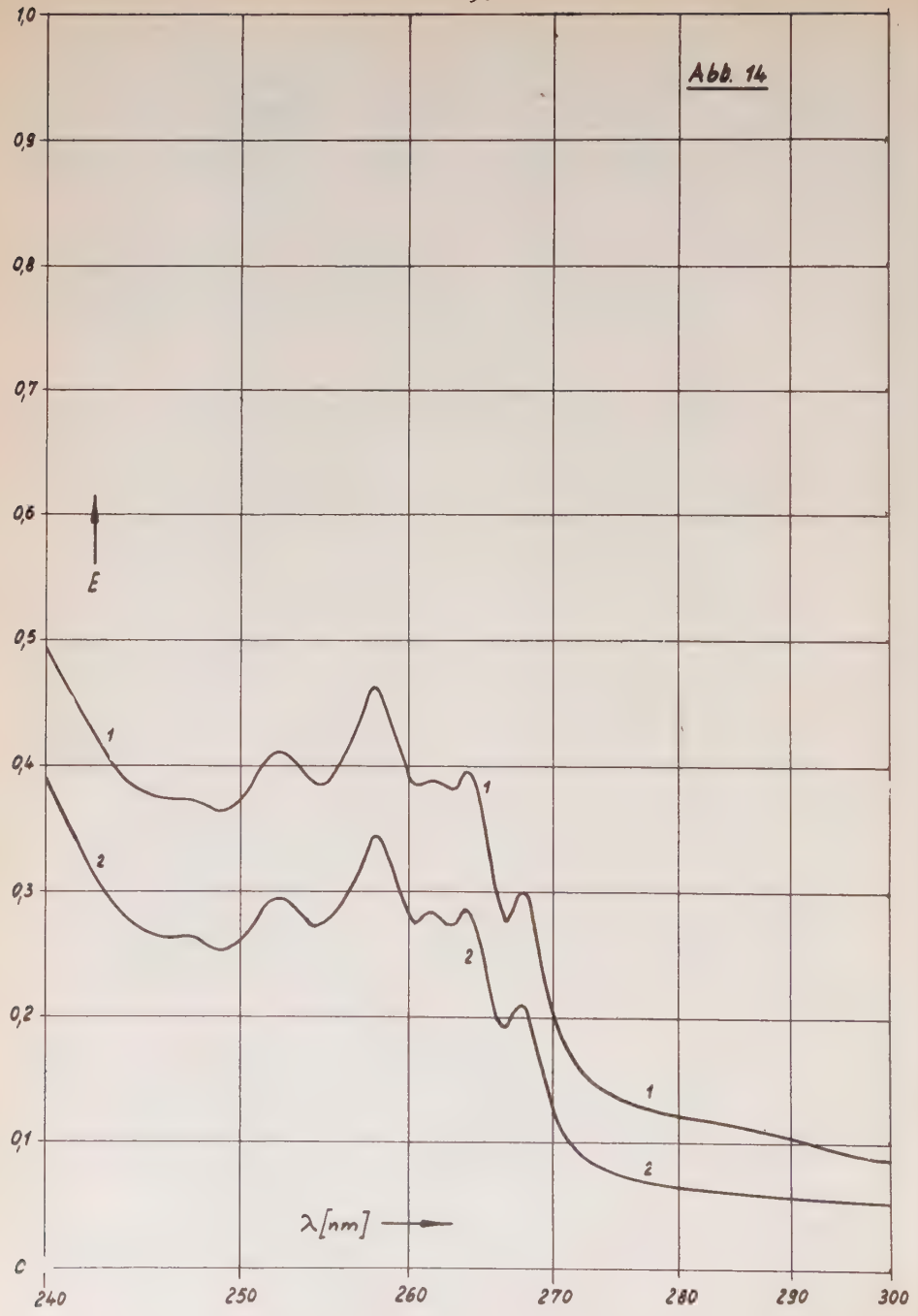


Abb. 14
1,0
0,9
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
E
1
2
1
2
1
2
λ[nm]
240
250
260
270
280
290
300

Ferner läßt sich zeigen,daß die UV-Absorptionskurve des schwefelfreien Präparates (Kurve 2,Abb.14) unverändert bleibt,wenn man die dem Wirkungsgruppengehalt entsprechende Menge nicht chemisch gebundenes L-Cystin zusetzt.

Diese im UV-Gebiet beobachteten spektroskopischen Unterschiede kommen auch bei dem Vergleich der IR-Absorptionsspektren zum Ausdruck.Dies zeigt die Abb.15. Beide Präparate unterscheiden sich hier insbesondere im Gebiet der Wellenlängen von 2,90 - 3,50 μ .Während für die schwefelfreie Verbindung das Absorptionsmaximum bei 2,95 μ relativ flach liegt,ist es dagegen bei der schwefelhaltigen wesentlich spitzer ausgefahren und um 0,10 μ auf 3,05 μ verschoben.Ferner zeichnet sich noch ein ausgeprägtes Absorptionsmaximum bei 3,44 μ ab.Beide Kurven unterscheiden sich nochmals bei 6,05 und 6,55 μ , indem der Verlauf beachtlich flacher bzw. steiler wird.

In Abb.16 werden die infrarotspektroskopischen Messungen für vollkommen freies Poly-L-Lysin-HBr mit und ohne L-Cystin-Wirkungsgruppe mitgeteilt.Die für die schwefelfreie Verbindung verbundene Abnahme der Absorption zwischen 3,10 - 3,45 μ ist für die schwefelhaltige vom Auftreten zweier Absorptionsmaximaspitzen bei 3,05 und 3,44 μ begleitet.Die Verhältnisse liegen ähnlich wie bei den vorher besprochenen Präparaten.

Schließlich gibt die Abb.17 noch Auskunft über die IR-Spektren von L-Cystindimethylester substituiertem Poly-ε-N-Cbzo-L-Lysin bzw. dem nicht substituiertem Präparat.Auch hier macht sich eine Unterschiedlichkeit beider Kurvenläufe bemerkbar,welche hauptsächlich im Gebiet zwischen 5,87 - 6,15 μ auftritt.So zeigt das nicht mit L-Cystindimethylester substituierte Polypeptid zwei Absorptionsmaxima bei 5,87 und 6,08 μ ,während das mit der Wirkungsgruppe substituierte Präparat drei Absorptionsmaxima bei 5,94, 6,08 und 6,15 μ ausbilden kann. Das Maximum bei 5,94 μ ist außerdem im Vergleich zur schwefelfreien Substanz von 5,87 μ um 0,07 μ verschoben.

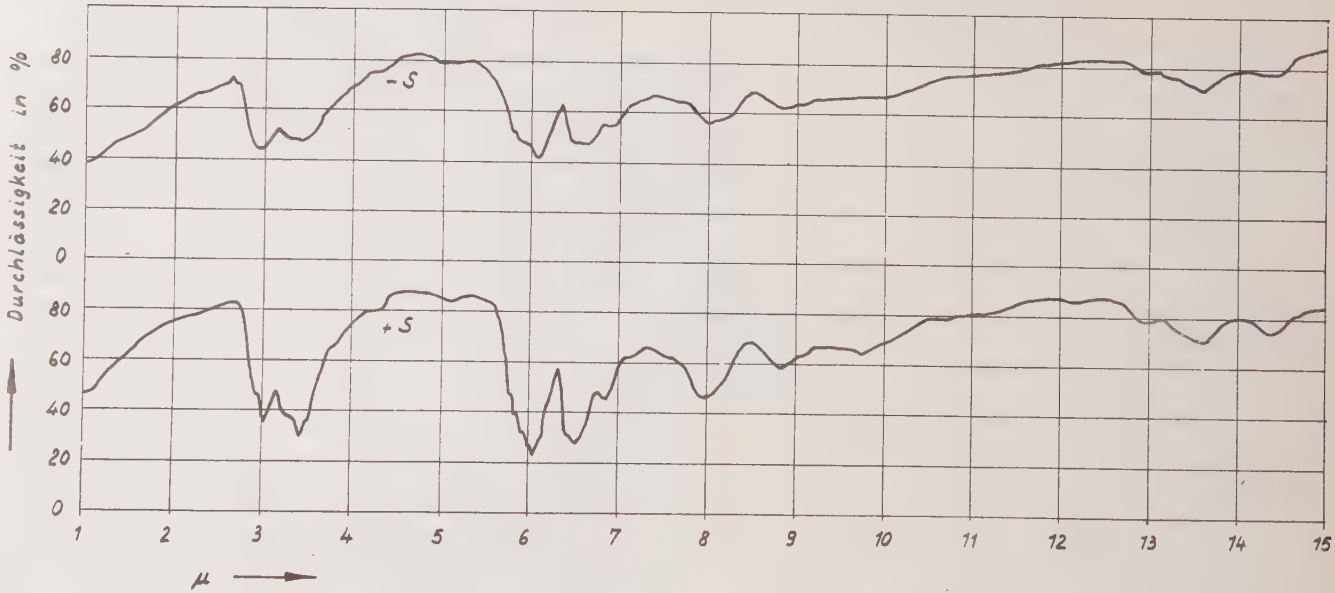

Durchlässigkeit in %
80
60
40
20
0
80
60
40
20
0
-S
+S
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
μ

Abb. 15

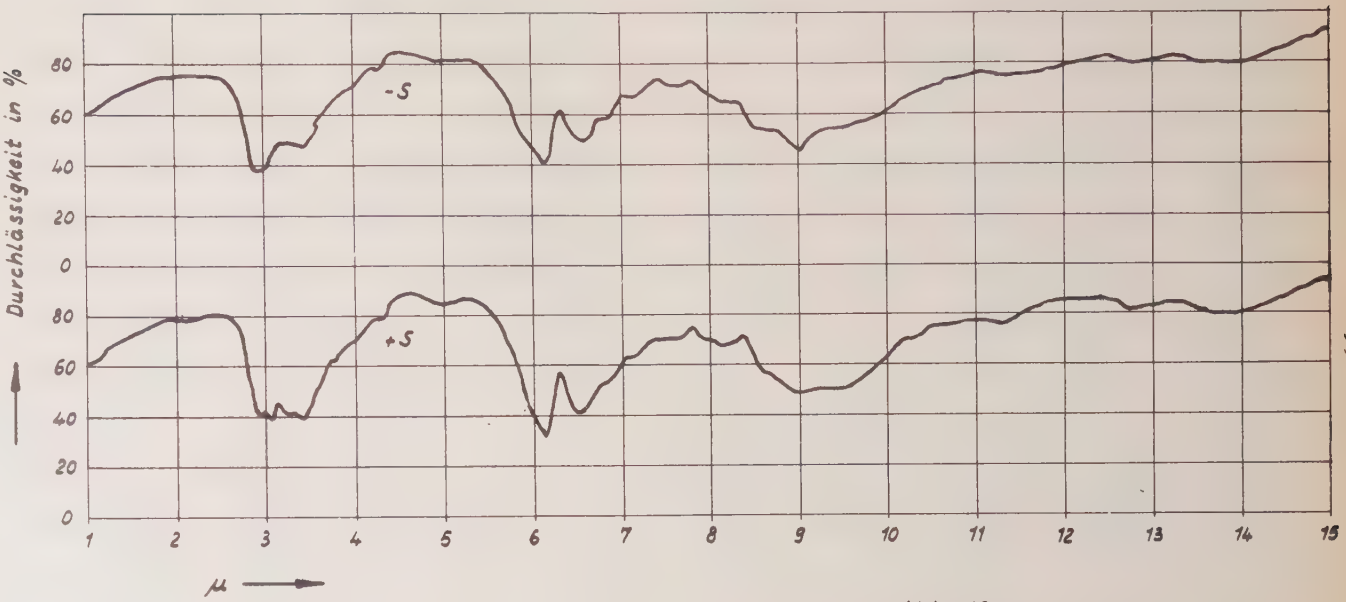

Durchlässigkeit in %
80
60
40
20
0
-S
80
60
40
20
0
+S
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
μ

Abb. 16

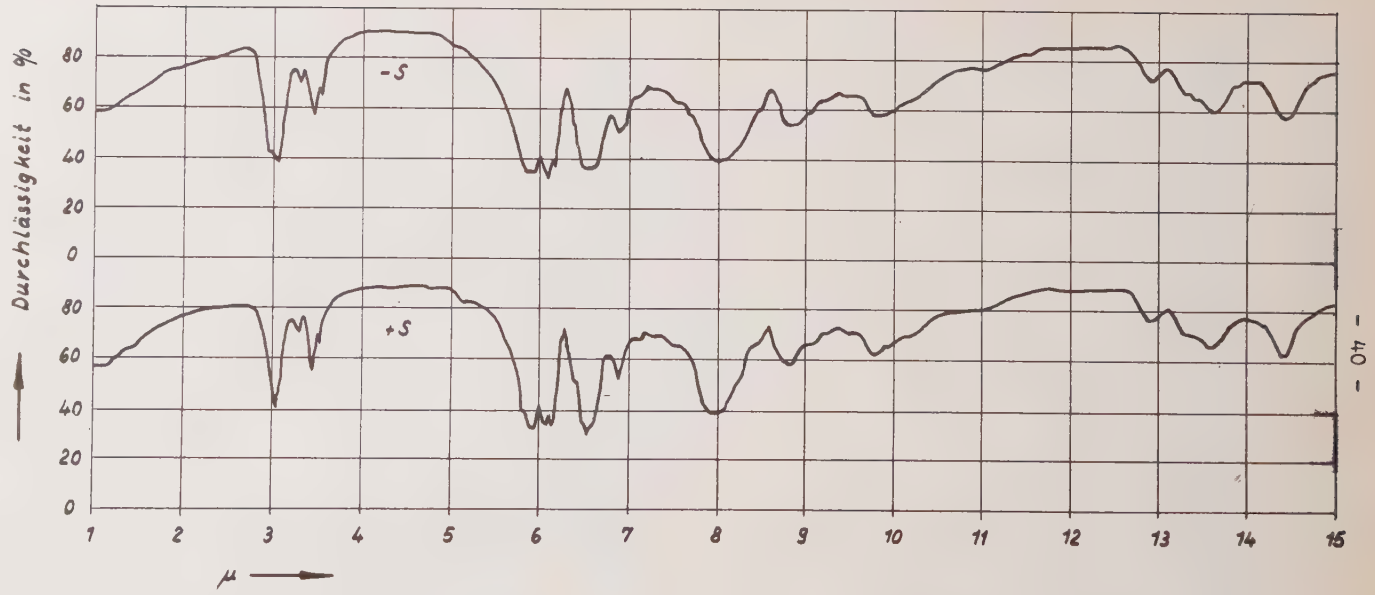

Durchlässigkeit in %
80
60
40
20
0
-S
+S
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
μ

Abb. 17

Auch bei der Aufnahme der IR-Absorptionsspektren bleibt ein Zusatz der L-Cystindimethylester-Wirkungsgruppenmenge zum schwefelfreiem Präparat ohne Einfluß auf die spektralen Eigenschaften.

Diese Ergebnisse stellen zweifellos Wechselbeziehungen der L-Cystin-Wirkungsgruppe mit der Polypeptidkette sicher und geben im Zusammenhang mit den weiter vorn erwähnten Resultaten Anlaß,die Ausbildung polarer Strukturen der Polypeptidkette durch Schwefel anzunehmen.Nach W. Lautsch (30) lassen sich Polarisationseffekte an α- und ß-konfigurierten Peptidketten über Elektronenleitung erklären.Während diese für die α-Form in einer Richtung über alternierende homöopolare und Triplettbindungen möglich ist,findet der Elektronentransport für die ß-Form gleichzeitig in beiden Richtungen über polare Dreipunktstrukturen mit Finelektronbindungen statt.Bei dieser Betrachtungsweise wird man auf eine Beteiligung des Schwefels am Elektronenleitungsmechanismus (Polarisation) der Polypeptidkette schließen dürfen.

7.) Der Einfluß von wasserfreier Dichloressigsäure auf Poly-L-Lysin-HBr mit und ohne L-Cystin-Wirkungsgruppe.

Eine Förderung polarer Strukturen der Polypeptidkette sollten stark polare Solventien,wie z.B. wasserfreie Dichloressigsäure,erwarten lassen.Die Vorgabe entsprechender Versuchsbedingungen sollte darüber hinaus im Grenzfall einen Peptidabbau möglich machen,wobei nach den bisherigen Befunden die Wirksamkeit des Polarisationskatalysators im Falle des L-Cystin-N,N'-Di-Poly-L-Lysin-HBr begünstigter sein mußte als bei dem freien,nicht substituierten Poly-L-Lysin-HBr.

Tatsächlich kommt dieser Unterschied zum Ausdruck, wenn man unter vergleichbaren Bedingungen,über die im experimentellen Teil ausführlich berichtet wird,beide

Präparate 4 Stunden bei 105°C in Dichloressigsäure stehen läßt und nach Aufarbeitung (Fällung mit absolutem Aether) die erhaltenen Reaktionsprodukte chromatagraphisch untersucht.

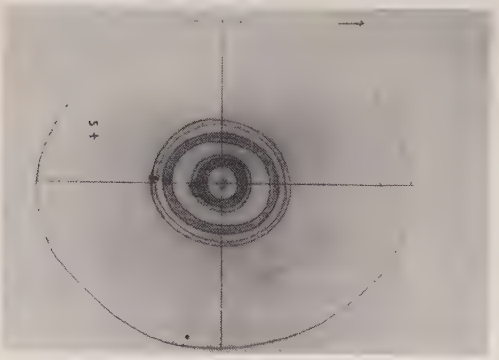


Abb.18 Poly-L-Lysin-HBr mit L-Cystin-Wirkungsgruppe nach Behandlung mit Dichloressigsäure.

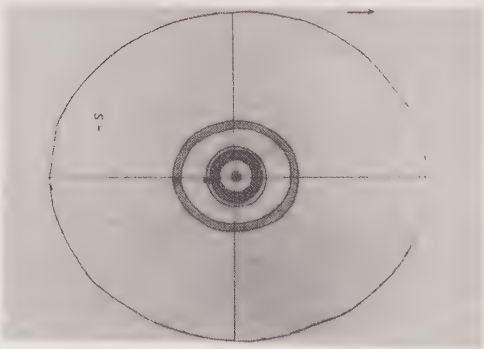


Abb.19 Poly-L-Lysin-HBr ohne L-Cystin-Wirkungsgruppe nach Behandlung mit Dichloressigsäure.

Die Abb. 18 zeigt auf einem Rundchromatogramm die durch Polarisation entstandenen Abbauprodukte der schwefelhaltigen Verbindung,während die Abb.19 die Verhältnisse unter gleichen Bedingungen für das schwefelfreie Präparat wiedergibt.Daraus erkennt man ohne weiteres, daß die Aufspaltung der Peptidbindung durch Polarisation mit Dichloressigsäure im Falle des mit L-Cystin-Wirkungsgruppe versehenen Poly-L-Lysin-HBr umfangreicher gelingt als bei dem freien Poly-L-Lysin-HBr.Denn in Abb.18 tritt eine Fraktion mehr auf und außerdem sind die Intensitäten der mit Ninhydrin angefärbten Bruchstücke erheblich stärker ausgeprägt.Ein unterschiedliches Merkmal ist ferner,daß sich die beiden Hauptfraktionbruchstücke im R_f-Wert sowohl in der Faserrichtung des Papiers↓als auch quer zu ihr unterscheiden.Sie betragen in:

Abb.18		Abb.19	
↓R_f:	$0,20_2$	↓R_f:	$0,22_8$
→R_f:	$0,17_3$	→R_f:	$0,20_4$

In Fortführung dieser Untersuchungen konnte außerdem durch Besprühen der Chromatogramme mit Nitroprussidnatrium- und KCN-Lösung gezeigt werden,daß die L-Cystin-Wirkungsgruppe an die polymere Ausgangssubstanz gebunden bleibt und nicht unter den abgespaltenen Bruchstücken auftritt.Vor der Behandlung mit Dichloressigsäure zeigen die Polymeren chromatographisch keine Bruchstücke.

Die Aufspaltung von Peptidbindungen mit wasserfreier Dichloressigsäure als polarisierendem Agens kann einen neuen und erfolgreichen Weg für die Synthese niedermolekularer L-Lysin-Peptide eröffnen.

Ob mit diesem Verfahren cyclische oder lineare Peptide entstehen,bleibt hier noch ungeklärt und ist späteren Untersuchungen vorbehalten.

C. Zusammenfassung.

Mit Hilfe manometrischer Messungen wurde der Polykondensationsverlauf von N-Carbonsäureanhydriden des L-Glutaminsäure-γ-benzylesters, L-Glutaminsäure-γ-methylesters und ε-N-Cbzo-L-Lysins mit O,S-substituierten L-Cystein-Initiatoren in Dioxan festgestellt.

Neben unterschiedlicher Wirkungsweise der in Frage gestellten Initiatoren konnte während der Polykondensation außerdem eine katalytische Sauerstoffübertragung auf Dioxan nachgewiesen werden. Bereits hier ergab sich eine Wechselbeziehung zwischen Schwefel und Polypeptidkette zu erkennen, indem die katalytische, auf Dioxan übertragene Sauerstoffmenge erhöht war, wenn anstelle von methylalkoholischer Natronlauge mit L-Cystindimethylester initiiert wurde.

Weiterhin wurde das chemische Verhalten von S-Benzyl- und S-Cbzo-Gruppen untersucht, welche über endständiges L-Cystein mit einer Poly-L-Glutaminsäure- bzw. Poly-L-Lysin-Kette verbunden sind. Dabei wurde beobachtet, daß die Schwefelschutzgruppenabspaltung im Vergleich zu S-Benzyl-L-Cystein und S,N-Di-Cbzo-L-Cystein beachtlich gehemmt ist.

Ferner wurden Wechselbeziehungen der L-Cystin-Wirkungsgruppe mit der Polypeptidkette sichtbar gemacht, indem die UV- und IR-Absorptionsspektren von Poly-ε-N-Cbzo-L-Lysin und Poly-L-Lysin-HBr mit und ohne L-Cystin-Wirkungsgruppe vergleichsweise beschrieben wurden.

Schließlich wurden diese Befunde in Zusammenhang gebracht mit Polarisationen der Peptidkette durch Schwefel. Diese Annahme fand eine weitere Stütze im Ergebnis über die Behandlung der entsprechenden, bereits optisch untersuchten Poly-L-Lysin-Hydrobromide mit wasserfreier Dichloressigsäure.

D. EXPERIMENTELLER TEIL

Darstellung S-substituierter L-Cystein-benzylester-hydrochloride.

Allgemeine Arbeitsvorschrift:

In einem Dreihalskolben mit Rührer und Rückflußkühler sättigt man unter Feuchtigkeitsausschluß 500 ml absoluten Aether bei 0°C mit trockenem Chlorwasserstoff, gibt zu dieser Lösung 43,2 g (0,4 Mol) frisch destillierten Benzylalkohol sowie das S-substituierte L-Cystein-NCA (0,1 Mol) und rührt bei Raumtemperatur eine Stunde lang. Dabei tritt Lösung ein.Schließlich bringt man die ätherische Lösung für weitere 45 Minuten zum Sieden.Nach dem Abkühlen verdünnt man mit absolutem Aether bis eine kristalline Abscheidung des Esterhydrochlorids einsetzt.Diese Mischung bewahrt man über Nacht im Eisschrank auf.Die abgesaugten und mit Aether gewaschenen Kristalle werden zur Umkristallisation in absolutem Methanol gerade gelöst und mit Aether bis zur ersten Trübung versetzt,wobei die Ester in gut ausgebildeten Nadeln anfallen.Mehrmaliges Umkristallisieren führt zu sauberen Präparaten mit festem Schmelzpunkt.

1.) S-Methyl-L-Cystein-benzylester-hydrochlorid,
$C_{11}H_{15}O_2N$ S,HCl - M: 261,77

Ansatz : 16,1 g S-Methyl-L-Cystein-NCA
Ausbeute : 19,4 - 20,2 g (74 - 77 % d.Th.)
Fp. : 128 - 129°C
$[\alpha]_D^{20}$: - 11,5° (c = 2,5,abs.Methanol)
Analyse :

	C	H	N	S	Cl
ber.:	50,42	5,77	5,35	12,24	13,53
gef.:	50,60	6,15	5,20	12,25	13,50

2.) S-Cbzo-L-Cystein-benzylester-hydrochlorid,
$C_{18}H_{19}O_4N$ S,HCl - M: 381,87

Ansatz : 28,1 g S-Cbzo-L-Cystein-NCA (16)
Ausbeute : 27,5 - 29,0 g (72 - 76% d.Th.)
Fp. : 135 - 136°C
$[\alpha]_D^{20}$: - 28,0° (c = 2,5 /abs.Methanol)
Analyse :

	C	H	N	Cl
ber.:	56,80	5,28	3,67	9,18
gef.:	56,83	5,12	3,99	9,38

3.) S-Benzyl-L-Cystein-benzylester-hydrochlorid,(31)
$C_{17}H_{19}O_2N$ S,HCl - M: 337,85

Fp. : 128°C
$[\alpha]_D^{20}$: - 27,5° (c = 2,5 /abs.Methanol)

4.) L-Cystin-di-benzylester-harnstoff,2 Aethanol,
$C_{21}H_{22}N_2O_5S_2$,2 C_2H_6O - M: 538,67

Ansatz : 29,2 g L-Cystin-di-NCA (32)
Ausbeute : 40,0 g (74 % d.Th.)
Fp.: : 86 - 87°C
$[\alpha]_D^{20}$: - 84,2° (c = 2,5 /abs.Methanol)
Analyse :

	C	H	N	S
ber.:	55,72	6,36	5,20	11,90
gef.:	55,65	5,76	5,16	11,30

Darstellung S-substituierter L-Cystein-methylester-hydrochloride.
Allgemeine Arbeitsvorschrift:

0,1 Mol S-substituiertes L-Cystein wird in 250 ml absolutem Methanol suspendiert und mit trockenem Chlor-

wasserstoff verestert.Nach vollkommener Lösung zieht man unter Feuchtigkeitsausschluß im Vakuum bis zur Trockene ab,nimmt erneut mit 100 ml absolutm Methanol auf,um für weitere drei Stunden mit HCl zu verestern.Schließlich verdünnt man mit absolutem Aether bis Kristallisation einsetzt.Nachdem man mehrmals aus abs.Methanol unter Zusatz von abs.Aether umkristallisiert hat,erhält man nadelförmige Kristalle.

1.) S-Methyl-L-Cystein-methylester-hydrochlorid,
$C_5H_{11}O_2N$ S,HCl - M: 185,68

Ansatz : 13,5 g S-Methyl-L-Cystein (14)
Ausbeute : 17,7 g (94 % d.Th.)
Fp. : 150 - 151°C
$[\alpha]_D^{20}$: - 4,0° (c = 2,13 / abs.Methanol)
Analyse :

	CH_3O	Cl
ber.:	16,71	19,10
gef.:	17,20	19,20

2.) S-Benzyl-L-Cystein-methylester-hydrochlorid,
$C_{11}H_{15}O_2N$ S,HCl - M: 261,77

Ansatz : 22,1 g S-Benzyl-L-Cystein (15)
Ausbeute : 23,5 - 24,6 g (90 - 94 % d.Th.)
Fp. : 156 - 157°C
$[\alpha]_D^{20}$: - 25,1° (c = 1,38 / abs.Methanol)
Analyse :

	CH_3O	Cl
ber.:	11,85	13,53
gef.:	11,85	13,65

3.) S-Cbzo-L-Cystein-methylester-hydrochlorid,
$C_{12}H_{15}O_4N$ S,HCl - M: 305,78

Ansatz : 25,5 g S-Cbzo-L-Cystein (16)

Ausbeute : 23,8 - 25,0 g (78 - 82 % d.Th.)
Fp. : 152 - 154°C
$[\alpha]_D^{20}$: - 13,8° (c = 2,5 / abs.Methanol)
Analyse :

	CH_3O	Cl
ber.:	10,15	11,60
gef.:	10,86	11,54

4.) L-Cystin-di-methylester-di-hydrochlorid,(33)

$C_8H_{16}O_4N_2S_2$,2 HCl - M: 341,26

Fp. : 172 - 173°C
$[\alpha]_D^{20}$: - 38,4 (c = 6,14 / abs.Methanol)

Darstellung von N,N'-Di-acetyl-L-Cystin-di-methylester,

Ansatz : Man versetzt 10 g L-Cystindimethylester mit Acetanhydrid in der Kälte.Nach kurzer Zeit kristallisiert die Verbindung aus. Umkristallisation aus Methanol/Aether.
Ausbeute : 11,2 g (85 % d.Th.)
Fp. : 131 - 132°C
$[\alpha]_D^{20}$: - 119,5° (c = 2,5 / abs.Methanol)
Analyse :

	C	H	N	CH_3O
ber.:	40,90	5,72	7,95	17,60
gef.:	40,80	5,67	7,97	17,06

Darstellung freier Aminosäureester aus den Aminosäureester-hydrochloriden, (19)
Allgemeine Arbeitsvorschrift:
für S-substituierte L-Cystein-ester.

Zur Darstellung dieser Verbindungen erfolgen sämtliche Schritte unter unbedingtem Ausschluß von Luftfeuchtigkeit.Es empfiehlt sich außerdem,unter Lichtausschluß zu arbeiten;zunächst stellt man sich bei 0°C

her: a.) eine wasserfreie,gesättigte Chloroform-Ammoniak-Lösung und b.) eine Suspension von 1g Esterhydrochlorid in 1 ml Chloroform mit Zusatz von 0,2 g Aktivkohle.Das Chloroform ist reinst zu verwenden.Dann setzt man zur Suspension b 4 ml der Lösung a hinzu,schüttelt gut durch und läßt die Mischung weitere 10 Minuten im Eisbad stehen, um schließlich zu filtriern und durch Vakuumdestillation das Chloroform so lange abzuziehen bis die Beilsteinprobe negativ bleibt.Die freien Ester fallen als wasserklare viskose Oele an,die sich im Hochvakuum ohne Zersetzung nicht destillieren lassen.Man kann sie im Vakuumexsiccator über P_2O_5 bei 0°C 24 Stunden aufbewahren,ohne daß irgendwelche Veränderungen nachweisbar sind.
Ausbeute : 65 - 88 % d.Th.

Darstellung der N-Carbonsäureanhydride des L-Glu-γ-benzylesters,L-Gluγ-methylesters,S-Benzyl-L-Cysteins und S-Methyl-L-Cysteins nach der Phosgenmethode von A.C. Farthing und R.J. Reynold. (20)

Eine Suspension von 15 g des entsprechenden L-Glutaminsäureesters (34) bzw. S-substituierten L-Cysteins, (14/15) wird in 200 ml gereinigtem Dioxan bei 35 - 40°C Wasserbadtemperatur so lange phosgenisiert bis vollständige Lösung erreicht ist.Danach wird das Einleiten von trockenem Phosgen noch eine Stunde fortgesetzt und schließlich das Dioxan bei gleicher Temperatur im Vakuum vollständige abgezogen.Den Rückstand löst man erneut in 75 ml Dioxan und destilliert nochmals ab.Die erhaltenen,schwach gelblichen Oele kristallisieren im Vakuumexsiccator über P_2O_5 und lassen sich sehr gut aus absolutem Benzol umkristallisieren,wenn etwas Dioxan zugesetzt wird.Sämtliche Reaktionsschritte erfolgen selbstverständlich unter Feuchtigkeitsausschluß.

1.) L-Glu-γ-benzylester-NCA,(34)

$C_{13}H_{13}O_5N$ - M: 263,2

Ausbeute : 15 g (90 % d.Th.)

Fp. : 96 - 97°C
$[\alpha]_D^{20}$: - 11,3° (c = 3,78 /Essigester)

2.) L-Glu-γ-methylester-NCA,(34)
$C_7H_9O_5N$ - M: 187,14
Ausbeute : 15 g (91 % d.Th.)
Fp. : 98 - 99°C
$[\alpha]_D^{20}$: - 24,2 (c = 6,2 /Essigester)

3.) S-Benzyl-L-Cystein-NCA,(35)
$C_{11}H_{11}O_3N\,S$ - M: 237,26
Ausbeute : 13 g (77 % d.Th.)
Fp. : 106°C
$[\alpha]_D^{20}$: - 43° (c = 1,5 /Dioxan)

4.) S-Methyl-L-Cystein-NCA,
$C_5H_7O_3N\,S$ - M: 161,18
Ausbeute : 13,2 g (75 % d.Th.)
Fp. : 83 - 84°C
$[\alpha]_D^{20}$: - 110,4° (c = 1,39 /Dioxan)

Analyse :

	C	H	N	S
ber. :	37,30	4,39	8,70	19,91
gef. :	37,45	4,28	8,71	19,64

Darstellung der N-Carbonsäureanhydride des ε-N-Cbzo-L-Lysins,S-Cbzo-L-Cysteins und L-Cystins nach der Leuchsschen Methode.(36)

1.) ε-N-Cbzo-L-Lysin-NCA,(21)
$C_{15}H_{18}O_5N_2$ - M: 306,32
Ansatz : 45 g trockenes α,ε-N-Di-Cbzo-L-Lysin(21) und 27 ml frisch über Bienenwachs dest.

Thionylchlorid (37) werden in 175 ml absolutem Aether gelöst.Diese Mischung hält man auf dem Wasserbad 2 Stunden im Sieden.Das NCA scheidet sich allmählich aus.Es wird unter Feuchtigkeitsausschluß abgesaugt,mit reichlich absolutem Aether gewaschen und aus abs. Benzol umkristallisiert.

Ausbeute : 25 - 28 g (76-85 % d.Th.)
Fp. : 100°C

2.) S-Cbzo-L-Cystein-NCA,(16)

$C_{12}H_{11}O_5N\,S$ - M: 281,28

Ansatz : 45 g N,S-Di-Cbzo-L-Cystein(16)
Ausbeute : 29,3 g (90 % d.Th.)
Fp. : 75°C

3.) L-Cystin-di-NCA,(32)

$C_8H_8O_6N_2S_2$ - M: 292,28

Ansatz : 45 g N,N'-Di-Carbäthoxy-L-Cystin,(32)
Ausbeute : 29,2 g (85 % d.Th.)
Fp. : 110°C

4.) D,L-Alanin-NCA,(38)

$C_4H_5O_3N$ - M: 115,10

Ansatz : 30 g N-Cbzo-D,L-Alanin,(39)
Ausbeute : 11 g (70 % d.Th.)
Fp. : 48 - 49°C

Reinigung von Dioxan.

1 Liter chemisch reines Dioxan (Riedel de Haen) wird mit 100 g Aetznatron mehrere Stunden am Rückfluß erhitzt und anschließend destilliert.1/5 Vorlauf,1/10 Rückstand.Die Hauptfraktion wird erneut mit 100 g Aetznatron 8 Stunden lang gekocht.Wenn das dabei geschmolzene Natriumhydroxyd über die gesamte Zeit farblos geblieben

ist,wird wieder fraktioniert destilliert.Gleiches Verhältnis.Die resultierende Hauptfraktion wird schließlich unter Stickstoff so lange mit ca. 50 g Natrium gekocht bis sämtliche Peroxyde zersetzt sind,und die Natriumkugeln auch nach dem Abkühlen metallischen Glanz behalten.Durch fraktionierte Destillation erhält man somit ein von aktiven Wasserstoffatomen und Peroxyden befreites Dioxan.

Darstellung von Polypeptiden mit O,S-substituierten L-Cystein-Wirkungsgruppen.

Allgemeine Arbeitsvorschrift:

Unter trockener,sauerstoffreier Stickstoffatmosphäre löst man das entsprechende Aminosäure-NCA in gereinigtem Dioxan zu einer ca. 4%igen Lösung auf,und schützt diese mit einem absteigenden P_2O_5-Trockenrohr gegen Luftfeuchtigkeit.Danach gibt man so viel einer S-substituierten L-Cystein-ester enthaltenden Dioxanlösung hinzu,daß theoretisch 25,50 oder 100 Aminosäureeinheiten pro freie Aminogruppe der Initiatormolekel kommen.Diese Mischung polykondensiert man unter fortdauernder Stickstoffatmosphäre bei 40° C 72 Stunden lang.Dann zieht man im Vakuum teilweise das Dioxan ab und läßt unter heftigem Rühren das erhaltene Polymerisat in das auf die Ausgangslösung bezogene zehnfache Volumen destillierte Wasser einlaufen. Der Polypeptidester fällt aus und wird abgesaugt.Er wird wiederholt in destilliertem Wasser suspendiert und so lange behandelt und gewaschen bis ihm kein Dioxan mehr anhaftet.Nachdem das Polypeptid außerdem noch mit warmem Alkohol behandelt worden ist,um niedermolekulare Anteile zu lösen,trocknet man es über P_2O_5 bei 46°C im Vakuum bis zur Gewichtskonstanz.Nach Pulvern im Achatmörser erhält man weiße,amorphe Substanzen mit Zersetzungspunkten, welche über 300°C liegen.Die Ausbeuten schwanken je nach eingesetztem Initiator beachtlich und sind nur mit L-Cystindimethylester als Initiator annähernd quantitativ.

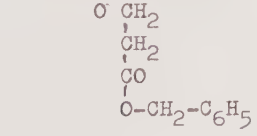
Initiatormolekeln:

1. L-Cystin-di-methylester, M: 268,32
2. S-Methyl-L-Cystein-methylester, M: 149,21
3. S-Methyl-L-Cystein-benzylester, M: 225,30
4. S-Benzyl-L-Cystein-methylester, M: 225,30
5. S-Benzyl-L-Cystein-benzylester, M: 301,38
6. S-Cbzo-L-Cystein-methylester, M: 269,31
7. S-Cbzo-L-Cystein-benzylester, M: 345,40

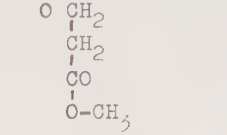
AS-Einheiten pro Initiator-NH_2	Initiatoranteil in mg						
	1	2	3	4	5	6	7
25	268	298	450	450	602	538	690
50	134	149	225	225	301	269	345

Verhältnis der AS-Einheiten	NCA-Anteil in g				
	A	B	C	D	E
	13,16				
		9,36			
			15,13		
					5,76
A : D = 2 : 1	8,69			3,25	

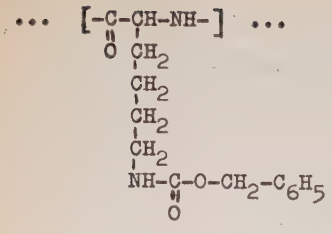
A: L-Glutaminsäure-γ-benzylester-NCA, M: 263,2
B: L-Glutaminsäure-γ-methylester-NCA, M: 187,1
C: ε-N-Cbzo-L-Lysin-NCA, M: 306,3
D: L-Phenylalanin-NCA, M: 191,2
E: D,L-Alanin-NCA, M: 115,1



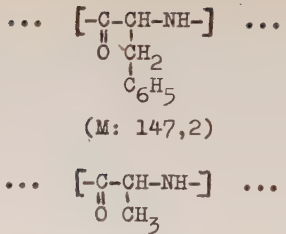
(M: 219,2)



(M: 143,1)



(M: 262,3)



(M: 147,2)

(M: 71,1);

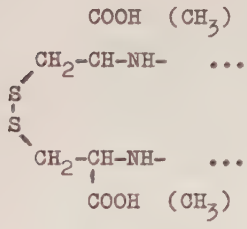
Die Abspaltung von N-Cbzo- und O-Benzylester-Schutzgruppen an Polypeptiden mit und ohne L-Cystin-Wirkungsgruppe in flüssigem SO_2 mit HBr.(29)
Modifizierte allgemeine Arbeitsvorschrift:

200 ml trockenes Schwefeldioxyd werden in einer Kühlfalle kondensiert.Kältebad: Methanol/festes CO_2, - 65°C.Auf gleiche Temperatur kühlt man nebenbei eine 500 ml Druckflasche ab,welche innen mit trockenem,sauerstoffreiem Stickstoff durchspült wird.In dieser Flasche befinden sich bereits 4 g des entsprechenden Polypeptids. Sie werden schließlich mit dem kondensierten SO_2 aufgelöst. Dann leitet man unter sorgfältigem Feuchtigkeitsausschluß aus einer unter Stickstoffatmosphäre stehenden Apparatur (zur HBr-Entwickelung aus Dekalin und Brom) 25 Minuten lang einen kräftigen Strom bromfreies Bromwasserstoffgas ein.Um Spuren von Feuchtigkeit bzw. auch von Brom zu entfernen,läßt man den Bromwasserstoff über mit P_2O_5 beschickte Glaswolle und durch zwei Waschflaschen mit Paraffinöl strömen.Die HBr-Entwickelung aus Dekalin und Brom verläuft sehr glatt bei Siedehitze und UV-Bestrahlung. Nach dem Einleiten schließt man die Druckflasche und läßt die Mischung 4 Stunden bei Zimmertemperatur stehen. Dann erst kühlt man die Flasche langsam wieder ab,um sie bei - 65°C zu öffnen.Das SO_2-HBr-Gemisch verdampft man rasch bei Raumtemperatur.Auf Feuchtigkeitsausschluß ist stets zu achten.Den Rückstand bewahrt man im Vakuumexsiccator über KOH auf.Das entstandene Benzylbromid extrahiert man weitgehend mit absolutem Aether.Zur

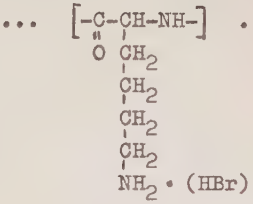
weiteren Reinigung fällt man die Präparate mehrmals aus entsprechenden Lösungsmitteln um. Sie zeigen Zersetzungspunkt über 300 - 350°C.
Ausbeute: 55 - 70 % d.Th. bezogen auf NCA

Umfällung:

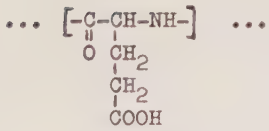
Präparat	Waschflüssigkeit	Lösungsmittel zur Umfällung
Poly-L-Lys-HBr	abs.Aether	Methanol/abs.Aether
Poly-L-Glu	Aethanol/Aether	Bicarbonatlösung, wenig Alkohol plus 11 n HCl
Poly-L-Glu-L-Phe	dto.	dto.



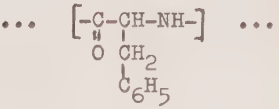
(M: 238,28)



(M: 129,19 bzw. 210,11)



(M: 129,11)



(M: 147,17)

Die Abspaltung von an Polypeptiden haftenden O-Methylester-Schutzgruppen mit Alkali in Gegenwart von $Cu(OH)_2$.(28)
(Nicht anwendbar bei Gegenwart von L-Cystin-Wirkungsgruppe, sonst hydrolytische Spaltung der Disulfidbindung)

3 g fein gepulverter Polypeptidmethylester werden

mit 6 ml Dioxan versetzt und bis zur Quellung stehen gelassen. Danach fügt man eine Lösung von 3 g $CuSO_4$,5 H_2O in 15 ml Wasser hinzu und schüttelt diese Mischung nach weiterer Zugabe von 60 ml 1 n NaOH 3 Stunden bei Raumtemperatur. Die tiefviolette Lösung wird filtriert und das Filtrat mit 11 n HCl angesäuert. Dabei fällt die freie Polypeptidcarbonsäure aus. Nach wiederholter Umfällung und gründlichem Waschen mit Wasser werden die Präparate im Vakuum über P_2O_5 getrocknet.

S-Acetylierung von L-Cystein-N-Poly-L-Glutaminsäure und L-Cystein-N-Poly-D,L-Alanin.

Allgemeine Arbeitsvorschrift:

Unter Stickstoffatmosphäre löst man 0,5 g L-Cystein-N-Polypeptid und eine Spur Natriumdithionit in der 20 - 30 fachen Menge eines Pyridin-Wasser-Gemisches (6:4). Zu dieser Mischung, welche sich am besten in einem Dialysiergefäß (40) befindet, läßt man langsam aus einem Tropftrichter eine Lösung von 1,5 ml S-Acetyl-thiophenol in 5 ml Pyridin zutropfen bis die Polypeptid-Sulfhydryl-Gruppe quantitativ acetyliert ist. Nach ca. 1 - 2 Stunden zieht man im Vakuum bei 40°C Wasserbadtemperatur die flüchtigen Bestandteile ab und behandelt den Rückstand mehrfach mit Aether. Danach löst man die Substanz in Bicarbonatlösung bzw. Wasser und extrahiert im Perforator weiterhin mit Aether noch anhaftende Reste von Thiophenol bzw. unumgesetzten S-Acetyl-thiophenol. Nach Abtrennung der ätherischen Schicht fällt man durch vorsichtiges Ansäurern mit HCl das S-acetylierte Polypeptid aus. Das Einschalten einer Dialyse empfiehlt sich. Durch wiederholtes Umfällen und Waschen mit Wasser, Alkohol und Aether bzw. nur mit beiden letzteren erhält man farblose amorphe Pulver mit deutlich verzögerter Nitroprussidreaktion und Zersetzungspunkten über 300 - 350°C.

Darstellung von S-Acetyl-Glutathion,(41)

$C_{12}H_{19}N_3O_7S$ - M: 349,3

Ansatz : 1 g Glutathion
Ausbeute : 0,79 g (70 % d.Th.)
Fp.(Z) : 204°C

Darstellung von S-Acetyl-α-L-Glutaminyl-L-Cystein,

$C_{10}H_{16}N_2O_6S$ - M: 292,25

Ansatz : 1g α-L-Glutaminyl-L-Cystein (42) und 6,1 g S-Acetyl-thiophenol werden unter Stickstoff in wässrig-methanolischer Lösung vom pH 3,3 gelöst und 24 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen.Nach dieser Reaktionsdauer werden die flüchtigen Bestandteile im Vakuum abdestilliert.Der Rückstand wird mehrmals mit Aether extrahiert und schließlich aus Eisessig mit Aether umkristallisiert.
Ausbeute : 0,84 g (72 % d.Th.)
Fp. : 160 - 161°C
Analyse :

	CH_3CO
ber. :	14,73
gef. :	14,50

S-Acetyl-Bestimmung nach F. Lynen (12)

Die Messung des S-Acetylgehaltes wurde mit dem lichtelektrischen Kolorimeter nach B. Lange(Berlin-Zehlendorf) bei der Hg-Linie 546 mμ durchgeführt.Die Schichtdicke der Küvetten betrug 1,002 cm.Es wurde die Extinktion gemessen von reinem Wasser,der Zusammensetzung ohne und mit Acylmercaptan.Die Mikroküvette enthielt:

1. wässrige Acylmercaptanlösung,mit dest. Wasser auf 2,25 ml ergänzt.
2. 1,50 ml gesättigte Ammoniumsulfatlösung
3. 0,40 ml Nitroprussidnatriumlösung(400 mg/10 ml)0°C

4. 0,35 ml konz. Ammoniak,p.a. (d: 0,91)

Ammoniak wurde der Mischung zuletzt zugesetzt und gleichzeitig die Nullzeit gestoppt.Zur Aufnahme einer Eichkurve wurden als Testsubstanzen verwendet: S-Acetyl-ß-mercapto-propionsäure-äthylester,S-Acetyl-thio-glykolsäure-äthylester und S-Acetyl-Glutathion.

S-Acetyl-Peptide und S-Acetyl-Polypeptide in Lösung bei pH 8,7 und 20°C.

Zur vergleichbaren Betrachtung wurden folgende Versuchsbedingungen herangezogen:

1. Konzentration an S-Acetyl = 10 γ S/ml
2. pH-Wert = 8,7 (Boratpuffer,falls verschoben,mit n/10 NaOH bzw. n/10 HCl elektrometrisch genau eingestellt.)
3. Temperatur = 20°C
4. Reaktion in Gegenwart von Luftsauerstoff
5. Zusatz von nicht substituiertem Polypeptid gewichtsmengenmäßig gleich dem mit S-Acetyl-L-Cystein substituierten Modell.

In Abhängigkeit zur Zeit wurde diesen Ansätzen jeweils 1 ml Lösung entnommen und die noch vorhandene Menge S-Acetyl mit Hilfe der verzögerten Nitroprussid-Reaktion bestimmt.Aus Parallelversuchen mit den entsprechenden SH-Verbindungen ging hervor,daß für die unter 1 - 5 genannten Bedingungen freie SH-Gruppen durch den Luftsauerstoff verhältnismäßig rasch oxydiert werden und innerhalb der S-Acetylnachweiszeiten nicht als Fehlerquelle erscheinen.

Abbau von L-Cystin-N,N'-Di-Poly-L-Lysin-HBr und Poly-L-Lysin-HBr in wasserfreier Dichloressigsäure.

Unter Feuchtigkeitsausschluß werden 4 mg des entsprechenden Polypeptids in 2 ml wasserfreier Dichloressigsäure gelöst,welche sich leicht aus 99%iger Säure (Riedel de Haen) durch kurzes Schütteln mit P_2O_5 in der

Kälte,anschließendem Dekantieren und fraktionierter Vakuumdestillation gewinnen läßt.Die Lösung hält man 4 Stunden lang auf 105°C.Nach dem Abkühlen fällt man mit reichlich absolutem Aether die Reaktionsprodukte aus.Sie werden zentrifugiert und so lange wiederholt mit absolutem Aether behandelt bis keine Dichloressigsäure mehr anhaftet.Der Rückstand wird über Nacht im Vakuumexsiccator über P_2O_5 aufbewahrt.

Chromatographie der Abbauprodukte.

Nachdem man den Rückstand mit 0,5 ml Wasser gelöst hat,trägt man auf fünf Rundchromatogrammbogen (Schleicher-Schüll 2043 b) kreisförmig je 0,1 ml auf.Man läßt die Lösung eintrocknen und legt die Bogen in gleicher Faserrichtung übereinander.Dann bringt man diesen Stoß auf eine plangeschliffene Glasplatte mit einem Loch im Mittelpunkt,durch welchen ein aus gleichem Papier gewickelter Docht herausragt.Auf die Bogen wird eine weitere Glasplatte gelegt und beide befinden sich zwischen einem Exsiccator und seinem Deckel.Im Exsiccator befindet sich das Lösungsmittelgemisch aus n-Butanol/Eisessig/Wasser im Verhältnis 4:1:1.Die Laufzeit beträgt 6 Stunden. Danach werden die Bogen an der Luft getrocknet und der oberste zur Besprühung mit Ninhydrin (0,2 g Ninhydrin in 95 ml n-Butanol und 5 ml 2-n-Essigsäure) abgetrennt. Die übrigen Bogen stehen für weitere Untersuchungen zur Verfügung.

Schwefelbestimmung nach H. Roth (43).

Nach dieser Ultramikromethode werden 5 - 6 mg schwefelhaltiges Polypeptid im Mikrobombenrohr oxydativ nach Carius aufgeschlossen.Das gebildete Sulfat wird mit Jodwasserstoff/Ameisensäure zu Schwefelwasserstoff reduziert und mit einem Wasserstoffstrom in eine Zinkacetatlösung übergetrieben.Das Zinksulfid wird mit schwefelsaurer Dimethyl-p-phenylendiaminlösung versetzt und das entstandene Leukomethylenblau wird mit Ferri-

ionen zu Methylenblau oxydiert.Die Färbung wird colorimetrisch bestimmt.Für Proben mit einem Schwefelgehalt unter 1% beträgt die Genauigkeit der Methode 3% absolut.

Absorptionsspektren.

Die Aufnahme der UV-Absorptionsspektren erfolgte mit dem Beckman-Spektro-Photometer DK-2.Die Konstanten betrugen:

Solvent,Sample/Ref. : p.a. Methanol
Speed : 5 - - - T Scale : 1x
Sens. : 0/50 - - - Period : 0-1
Time Const. : 6

Konzentration der Monomeren : 10^{-3} molar
Konzentration der Polymeren : 9,64 mg/10 ml
(L-Cystin-N,N'-Poly-L-Lysin-HBr bzw. Poly-L-Lysin-HBr, jeweils noch mit 1/3 N-Cbzo-Gruppen substituiert)

Zur Aufnahme der IR-Absorptionsspektren mit dem vollautomatischen Infrarotspektrograph der Fa. W.Leitz, Wetzlar wurden jeweils 3 mg Substanz in 700 mg KBr gelöst.

Konstanten:

Rückführung : 6,5 - - Zeitkonstante R : 5
C : 1 - - Thermostat : 32^{0}C
Min. pro : 3

E. LITERATURVERZEICHNIS.

(1) O.Warburg,Schwermetalle als Wirkungsgruppen von Fermenten (Berlin 1946)

O.Warburg,Wasserstoff übertragende Fermente (Berlin 1948)

(2) H.von Euler,Chemie der Hefe und der alkoholischen Gärung (Leipzig 1915)

H.von Euler,Chemie der Enzyme (München 1922)

(3) W.Lautsch,W.Broser,U.Döhring und H.Zoschke, Naturwiss.38,210 (1951)

W.Broser,W.Lautsch,Naturwiss.38,208 (1951)

W.Lautsch und Mitarb.,Kolloid-Z.144,82 (1955)

W.Lautsch,W.Biedermann und W.Broser,Naturwiss.38, 478 (1951)

(4) W.Lautsch,W.Broser,W.Biedermann und H.Gnichtel, Angew.Chem.66,123 (1954)

W.Lautsch,E.Schröder,Z.Naturforschg.9b,277 (1954)

W.Lautsch,H.Gnichtel,I.Gnichtel und E.Höfling, Kolloid.-Z.141,132 (1955)

(5) W.Lautsch und Mitarb.,Kolloid.-Z.161,13 (1958)

(6) W.Lautsch und Mitarb.,Chimia,13,129 (1959)

(7) E.Ambrose und Mitarb.,Proc.Roy.Soc.A 208,75 (1951)

(8) P.Doty,A.M.Holtzer,J.H.Bradbury und E.R.Blout, J.Am.Chem.Soc.76,4493 (1954)

J.T.Yang und P.Doty,J.Am.Chem.Soc.79,764 (1957)

(9) W.Lautsch und Mitarb.,Chimia,13,134 (1959)

(10) L.Pauling und Mitarb.,Proc.nat.Acad.Sci.USA,37, 205,235 (1951)

(11) V.du Vigneaud,J.Biol.Chem.75,393 (1927)

(12) F.Lynen und E.Reichert,Angew.Chem.63,47 (1951)

F.Lynen,E.Reichert und L.Rueff,Liebigs Ann.Chem. 574,1 (1952)

(13) V.Bruckner und J.Kovacs,Acta Chim.Hung.3,361 (1953)

(14) M.D.Armstrong und J.D.Lewis,J.Org.Chem.16,749 (1951)

(15) V.du Vigneaud und J.L.Wood,J.Biol.Chem.130,110 (1939)

(16) A.Berger,J.Noguchi und E.Katchalski,J.Am.Chem.Soc. 78,4483 (1956)

(17) Th.Wieland und H.Köppe,Liebigs Ann.Chem.588,20(1954)

(18) B.F.Erlanger und E.Brand,J.Am.Chem.Soc.73,3508 (1951)

(19) J.Hillmann,Z.Naturforschg,1,682 (1946)

(20) A.C.Farthing und R.J.Reynold,Nature(London)165, 4199 (1950)

(21) M.Bergmann,L.Zervas und W.F.Ross,J.Biol.Chem. 111,245 (1935)

(22) O.Warburg und Mitarb.,Biochem.Z.152,51 (1924),
(23) 164,481 (1925),204,322 (1929),242,170 (1931)

(24) G.Wittig und G.Pieper,Liebigs Ann.Chem.546,172 (1941)

(25) G.Briegleb,Zwischenmolekulare Kräfte und Molekülstruktur,Stuttgart (1937)

(26) V.du Vigneaud und G.L.Miller,J.Biol.Chem.116,469 (1936)

V.du Vigneaud und R.H.Sifferd,J.Biol.Chem.108,753 (1934)

(27) C.R.Harington und T.H.Mead,Biochem.J.30,1594 (1936)

(28) V.Bruckner,J.und K.Kovacs,Acta Chim.Hung.5,267 6,218,7,223

(29) E.R.Blout und M.Idelson,J.Am.Chem.Soc.78,497 (1956)

(30) W.Lautsch,Kolloid.Z.167,145 (1959)

(31) W.Lautsch und H.Gnichtel,Kolloid.Z.161,46 (1958)

(32) E.M.Petri und A.J.Staverman,Recueil des Travaux Chimigues des Pays-Bas 71,385 (1952)

(33) E.Fischer und H.Suzuki,Z.f.physiol.Chem.45,405 (1905)

(34) W.E.Hanby,S.G.Waley und J.Watson,J.Chem.Soc.3244, 3245 (1950)

(35) J.Rudinger und F.Sorm,Coll.Czechoslov.Chem.Comm. 16,214 (1951)

(36) H.Leuchs und W.Geiger,Ber.Dtsch.Chem.Ges.39,857, (1906),40,3235 (1907),41,1721 (1908)

(37) E.Katchalski,I.Grossfeld und M.Frankel,J.Am.Chem. Soc. 69,2564 (1947),70,2094 (1948)

(38) J.L.Bailey,J.Chem.Soc.3463 (1950)

(39) Org.Synth.23,15

(40) Diplomarbeit Vollmann,Freie Universität Berlin, (1956)

(41) Th.Wieland und E.Bokelmann,Z.f.Angew.Chem.64,59 (1952)

(42) Th.Wieland und H.L.Weidenmüller,Liebigs Ann.Chem. 597,121 (1955)

(43) H.Roth,Mikrochem.36/37,,379 (1951)

Vorliegende Arbeit wurde im Institut für organische Chemie der Freien Universität Berlin angefertigt.

Herrn Professor Dr. W. Lautsch danke ich sehr verbunden für die wertvollen Anregungen und die immer gewährte Unterstützung zur Durchführung der Arbeit sowie für die großzügige Bereitstellung der Mittel.

Lebenslauf.

Am 4. Juli 1929 wurde ich als Sohn des Kaufmanns Erwin Vollmann und seiner Ehefrau Marion Vollmann, geborenen Streller, zu Altenburg in Thüringen geboren. Nach vier Grundschuljahren in der Gebrüder Reichenbach Schule besuchte ich ab 1940 die staatliche Oberschule für Jungen - spätere Einheitsschule für Jungen -, an welcher ich im Juli 1948 die Reifeprüfung bestand. Bis zur Aufnahme des Hochschulstudiums mit Fachrichtung Chemie an der Freien Universität Berlin im Jahre 1949 nahm ich in Altenburg an einem Dolmetscherlehrgang für Englisch teil. Im Mai 1952 legte ich die Diplom-Vorprüfung ab. Das Hauptdiplom erwarb ich im März 1956 und seit Mai 1958 bin ich als wissenschaftlicher Assistent am Institut für organische Chemie der Freien Universität Berlin tätig.